

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2013
SUPPLEMENT 7**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Anna Korzon-Burakowska

**Znaczenie wariantów genetycznych
triady molekularnej *OPG/RANKL/RANK*
w rozwoju neuroosteoartropatii Charcota
w cukrzycy typu 1 i 2**

*The role of polymorphisms in OPG, RANKL and RANK
genes in Charcot neuroosteoarthropathy
in type 1 and type 2 diabetes*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii
Kierownik: prof. dr hab. med. Bogdan Wyrzykowski
Zakład Prewencji i Dydaktyki
Kierownik: dr hab. med. Tomasz Zdrojewski

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowyra
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Anna Grygorowicz, Andrzej Hellmann,
Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmieć, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Dziękuję Panu Prof. dr. hab. med. Bogdanowi Wyrzykowskiemu oraz Panu dr. hab. med. Tomaszowi Zdrojewskiemu za stworzenie warunków dla powstania tej pracy.

Szczególne podziękowania składam Panu Prof. dr. hab. Grzegorzowi Węgrzynowi za liczne konsultacje i nieocenioną pomoc merytoryczną.

Pani Prof. dr hab. Joannie Jakobkiewicz-Baneckiej serdecznie dziękuję za poświęcony czas i wsparcie podczas pisania tej pracy.

Dziękuję również Kolegom z International Diabetic Foot Study Group – dr Ninie Petrovej i dr Robertowi Frykbergowi za inspirację do napisania niniejszej rozprawy.

Praca finansowana w ramach projektu badawczego N N402 309936

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	14
1.1. Rozważania ogólne	14
1.1.1. Epidemiologia cukrzycy	14
1.1.2. Niektóre czynniki patogenetyczne cukrzycy. Aspekty genetyczne	16
1.1.3. Powikłania cukrzycy	20
1.2. Neuroosteopropatia Charcota	28
1.2.1. Rys historyczny	28
1.2.2. Epidemiologia	31
1.2.3. Czynniki ryzyka	31
1.2.4. Przebieg kliniczny	34
1.2.5. Rozważania etiopatogenetyczne	39
1.2.6. Rola biologiczna osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK	44
1.2.7. Udział cytokin OPG/RANKL/RANK w patogenezie neuroosteopropatii Charcota	53
1.2.8. Proponowana sekwencja zdarzeń metabolicznych wyjaśniająca uszkodzenie naczyń w neuroosteopropatii Charcota	56
1.2.9. Aspekty genetyczne w patogenezie neuroosteopropatii Charcota	59
1.2.10. Diagnostyka neuroosteopropatii Charcota	61
1.2.11. Leczenie	64
2. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU	68
3. CEL PRACY	73
4. MATERIAŁ I METODY	74
4.1. Pacjenci	74
4.1.1. Zasady włączenia do badania	74
4.1.2. Podział na grupy	74
4.1.3. Zasady kwalifikacji pacjentów do grup	75
4.1.4. Podstawy diagnostyczne kwalifikacji do grup	76
4.1.5. Charakterystyka i liczebność poszczególnych grup badanych pacjentów	77
4.2. Metody	79
4.2.1. Badanie lekarskie	79
4.2.2. Badania laboratoryjne	80
4.2.3. Oznaczanie stężenia OPG w surowicy	81
4.2.4. Oznaczanie stężenia RANKL w surowicy	81
4.2.5. Badania genetyczne	82
4.2.6. Metody analizy statystycznej	91
5. WYNIKI	93
5.1. Charakterystyka badanych osób	93
5.2. Inne powikłania cukrzycy w badanych grupach chorych	96
5.3. Analiza polimorfizmów genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i> w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej	101
5.3.1. Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>OPG</i>	115
5.3.2. Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>RANKL</i>	117
5.3.3. Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>RANK</i>	117

5.4.	Występowanie poszczególnych polimorfizmów genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i> a stężenie <i>OPG</i> i <i>RANKL</i> w osoczu w badanych grupach chorych.....	118
5.5.	Analiza regresji logistycznej.....	122
6.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ.....	126
6.1.	Charakterystyka grup badanych.....	126
6.2.	Stężenie cytokin <i>OPG</i> i <i>RANKL</i> w osoczu oraz stosunek stężenia <i>OPG</i> / <i>RANKL</i> w badanych grupach chorych.....	127
6.3.	Ocena badanych polimorfizmów genów <i>OPG</i> (245T>G, 950T>C, 1181G>C, C1217T, 6890A>C, <i>RANKL</i> (290C>T, 643C>T, 693G>C) i <i>RANK</i> (421C>T, 575C>T).....	128
6.4.	Analiza nierównowagi sprzężeń w badanych genach <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i>	129
6.5.	Poziomy cytokin <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i> a polimorfizmy genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i>	129
6.6.	Analiza regresji logistycznej.....	130
7.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	132
7.1.	Omówienie i dyskusja dotycząca charakterystyki grupy badanej.....	139
7.2.	Omówienie i dyskusja dotycząca polimorfizmu genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i>	143
7.3.	Omówienie i dyskusja dotycząca analizy nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów.....	151
7.4.	Omówienie i dyskusja dotycząca stężeń osteoprotegeryny, <i>RANKL</i> i <i>RANK</i> w w surowicy krwi w cukrzycy i jej powikłaniach.....	153
7.5.	Omówienie i dyskusja dotycząca poziomów <i>OPG</i> i <i>RANKL</i> w surowicy krwi i polimorfizmów genów tych cytokin.....	155
7.6.	Podsumowanie.....	156
8.	WNIOSKI.....	158
9.	PIŚMIENNICTWO.....	160
10.	STRESZCZENIE.....	192
11.	SUMMARY.....	197
12.	ANEKS.....	202
12.1.	Warianty polimorficzne genów kodujących triadę <i>OPG</i> / <i>RANKL</i> / <i>RANK</i>	202
12.2.	Występowanie poszczególnych polimorfizmów genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> i <i>RANK</i> a stężenie <i>OPG</i> w osoczu w badanych grupach chorych (łącznie) ...	203
12.3.	Analiza nierównowagi sprzężeń dla polimorfizmów genów <i>OPG</i> , <i>RANKL</i> , <i>RANK</i> w całej badanej populacji oraz w poszczególnych grupach.....	205

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABI	wskaźnik kostka-ramię/ <i>ankle brachial index</i>
Acil	enzym restrykcyjny / <i>restriction enzyme</i>
AE	bufor do elucji (komercyjnie dostępny, zestaw Qiagen)/ <i>elution buffer-commercially available, Qiagen set</i>
AGE	zaawansowane produkty glikacji/ <i>advanced glycation end products</i>
AL	bufor do lizy (komercyjnie dostępny, zestaw Qiagen)/ <i>lysis buffer-commercially available, Qiagen set</i>
AP	projekcja przednio-tylna/ <i>anterior-posterior</i>
ATP	adenozyno-5'-trifosforan/ <i>adenosine triphosphate</i>
AW1	bufor do płukania 1-komercyjnie dostępny, zestaw Qiagen/ <i>wash buffer-commercially available, Qiagen set</i>
AW2	bufor do płukania 2-komercyjnie dostępny, zestaw Qiagen/ <i>wash buffer-commercially available, Qiagen set</i>
BMD	gęstość mineralna kości/ <i>bone mineral density</i>
BMI	wskaźnik masy ciała/ <i>body mass index</i>
BMU	podstawowa jednostka wielokomórkowa (<i>basic multicellular unit</i>)
C	grupa kontrolna / <i>control group</i>
cAMP	cykliczny adenzyno monofosforan / <i>cyclic adenosine mono-phosphate</i>
CAP	kalpaina/ <i>calpain</i>
CD4 T-helper	antygen różnicowania komórkowego na powierzchni limfocytu T pomocniczego/ <i>cell surface markers expressed by T-helper lymphocytes</i>
CGRP	peptyd związany z genem kalcytoniny/ <i>calcitonine gene related polipeptide</i>

CN	neuroosteoartropatia Charcota / <i>Charcot neuroosteoarthropathy</i>
CRP	białko C-reaktywne/ <i>C-reactive protein</i>
CSF	czynnik stymulujący powstawanie kolonii/ <i>colony stimulating factor</i>
D	grupa z cukrzycą bez neuropatii/ <i>diabetes without neuropathy group</i>
dATP	trójfosforan dezoksyrybozo adeninowy/ <i>deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	trójfosforan deoksyrybozocytozyny/ <i>deoxycytidine triphosphate</i>
ddNTP	dideoksynukleotydy/ <i>dideoxynucleotide</i>
dGTP	trifosforan guanozyny/ <i>deoxyguanosine triphosphate</i>
dNTP	deoksynukleotydy/ <i>deoxynucleotide</i>
dTTP	trifosforan deoksytymidyny / <i>deoxythymidine triphosphate</i>
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy/ <i>ethylenediaminetetraacetate</i>
ELISA	test immunoenzymosorbcyjny/ <i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
ExoI	egzonukleaza I/ <i>exonuclease</i>
ExoSap	egzonukleaza i alkaliczna fosfataza / <i>exonuclease and alkaline phosphatase</i>
fCSI	wskaźnik wytrzymałości szyjki kości udowej / <i>femoral neck compression strength index</i>
FFA	wolne kwasy tłuszczowe/ <i>free fatty acids</i>
FGF-2	czynnik wzrostu fibroblastów / <i>fibroblast growth factor</i>
GAD	przeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego/ <i>glutaminic acid decarboxylase antibodies</i>
GKS	glikokortykosterydy/ <i>glucocorticoids</i>

HbA1c	hemoglobina glikowana/ <i>glycated hemoglobin</i>
HincII	enzym restrykcyjnyII / <i>restriction enzyme II</i>
HinfI	enzym restrykcyjnyI/ <i>restriction enzyme I</i>
HLA	układ zgodności tkankowej/ <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HLA-DR	ludzkie antygeny leukocytarne rejonu DR/ <i>Human Leukocyte Antigen DR</i>
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa/ <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IA-2	fosfataza tyrozyny białkowej/ <i>protein tyrosine phosphatase-like protein</i>
IAA	autoprzeciwciała przeciw insulinie/ <i>insulin autoantibodies</i>
IAPP	amylina/ <i>islet amyloid polipeptide</i>
ICA	przeciwciała przeciw wyspce/ <i>islet cells antibodies</i>
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu/ <i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	immunoglobulina G/ <i>immunoglobulin G</i>
IgM	immunoglobulina M/ <i>immunoglobulin M</i>
IL-1	interleukina 1/ <i>interleukin 1</i>
IL-11	interleukina 11/ <i>interleukin 11</i>
IL-6	interleukina 6 / <i>interleukin 6</i>
IMT	grubość błony wewnętrznej i środkowej/ <i>intima media thickness</i>
kDa	kilodalton
LADA	cukrzyca typu LADA/ <i>latent autoimmune diabetes in adult</i>
LD	niezrównoważenie sprzężeń/ <i>linkage disequilibrium</i>

LIF	czynnik hamujący białaczkę/ <i>leucaemia inhibitory factor</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
mRNA	matrycowy (informacyjny, przekaźnikowy) kwas rybonukleinowy/ <i>messenger ribonucleic acid</i>
N	grupa chorych z neuropatią bez neuroosteoartropatii/ <i>neuropaty without Charcot neuroarthopathy group</i>
NAD	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy/ <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NFAT-c1	czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T/ <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	czynnik jądrowy kappaB/ <i>nuclear factor kappa B</i>
NGF	czynnik wzrostu nerwu/ <i>nerve growth factor</i>
ODF	czynnik różnicowania osteoklastów/ <i>osteoclast differentiation factor</i>
OPG	osteoprotegeryna/ <i>osteoprotegerin</i>
PCR	reakcja łańcuchowej polimerazy/ <i>polymerase chain reaction</i>
PET	pozytonowa emisyjna tomografia komputerowa/ <i>positron emission tomography</i>
PGE	prostaglandyna E/ <i>prostaglandin E</i>
PKC	kinaza proteinowa C/ <i>protein kinase C</i>
PPAR	receptor aktywowany przez czynniki wywołujące proliferację peroksisomów / <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne/ <i>Polish Diabetic Association</i>
PTH	parathormon/ <i>parathormone</i>
PTHrP	peptyd PTH-podobny/ <i>PTH -related peptide</i>
<i>PTP1B</i>	białkowa fosfataza tyrozynowa 1B/ <i>protein-tyrosine phosphatase 1B</i>

RANK	aktywator receptora jądrowego czynnika κ B/ <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B/ <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RFLP	metoda identyfikacji polimorfizmów z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych/ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RZS	reumatoidalne zapalenie stawów/ <i>rheumatoid arthritis</i>
SAP	alkaliczna fosfataza z krewetek / <i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu/ <i>single nucleotide polymorphism</i>
TBE	roztwór buforowy o składzie Tris, kwas borowy i EDTA/ <i>Tris/Borate/EDTA Buffer</i>
TCC	opatrunek gipsowy/ <i>total contact cast</i>
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu- β 1/ <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF- α	czynnik martwicy guza α / <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNF- α R	receptor czynnika martwicy guza α / <i>Tumor Necrosis Factor α receptor</i>
TRAF-6	czynnik związany z receptorem TNF6 / <i>TNFreceptor associated factor 6</i>
TRAIL	ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę / <i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRANCE	<i>tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine</i>
VLDL	lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości/ <i>very low density lipoprotein</i>
VSMCs	komórki mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych/ <i>vascular smooth muscle cells</i>
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia / <i>World Health Organization</i>
ZSC	zespół stopy cukrzycowej/ <i>diabetic foot syndrome</i>

1. WSTĘP

1.1. Rozważania ogólne

1.1.1. Epidemiologia cukrzycy

Cukrzycę określa się współcześnie jako „globalną epidemię” naszego wieku. Na całym świecie obserwuje się lawinowy wzrost zachorowań na tę chorobę. Najliczniejsze badania epidemiologiczne dotyczą cukrzycy typu 2, występującej najczęściej.

Ostatnie badania (2011 r.) wykazały, że chorych na cukrzycę jest obecnie około 366 milionów, a w 2030 r. przewiduje się wzrost zachorowań do 552 milionów chorych [1].

Definicja cukrzycy została sformułowana przez Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne w 1977 r.: „Cukrzyca, to grupa heterogennych zaburzeń metabolicznych z towarzyszącą hiperglikemią, spowodowaną niedostateczną utylizacją glukozy w wyniku defektu wydzielania insuliny lub jej działania. Przewlekła hiperglikemia prowadzi do zmniejszenia zdolności komórek β trzustki do produkcji insuliny, ale także insulinooporności tkanek i zwiększonej produkcji glukozy w wątrobie”. Mimo upływu lat definicja ta jest nadal aktualna [2, 3].

W krajach europejskich częstość występowania cukrzycy ocenia się przeciętnie na 5-7% ludności, a w Stanach Zjednoczonych jest ona jeszcze większa [2].

Śmiertelność z powodu powikłań cukrzycy, mimo coraz wcześniejszego ustalania rozpoznania oraz coraz bardziej skutecznego leczenia, wzrosła w ostatnich latach o 30%, podczas gdy z powodu innych chorób zmalała [4]. U podstaw narastania liczby chorych leży najprawdopodobniej wzrost ilości ludzi otyłych oraz zmiana trybu życia, polegająca na znacznym zmniejszeniu aktywności fizycznej, globalizacji i industrializacji. Te zmiany dotyczą wszystkich społeczeństw.

Zwiększenie liczby rozpoznawanych przypadków cukrzycy wiąże się także ze zmienionymi i rozszerzonymi kryteriami diagnostycznymi ustalonymi w ostatnich latach przez WHO [5] oraz Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne [3], polegającymi na obniżeniu progu glikemii koniecznej do ustalenia rozpoznania.

W ostatnich latach obserwuje się także wzrost zapadalności na cukrzycę typu 2, także u dzieci i młodzieży [6, 7, 8]. Uważa się, że liczba chorych dzieci i młodzieży na tę postać cukrzycy jest nadal niedoszacowana.

Na cukrzycę typu 1 choruje około 20 milionów osób, w tym w Polsce około 150 tys. [9]. Cukrzyca typu 1 jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych wieku rozwojowego i dotyczy jednego na 300 dzieci [10]. Często występujące w tej postaci cukrzycy poważne powikłania: choroby nerek, narządu wzroku, układu sercowo-naczyniowego oraz nasilone, trudne do wyrównania, ostre zaburzenia metaboliczne w postaci ketozy i śpiączki powodują, że jest ona jedną z ważnych przyczyn śmiertelności w młodym wieku.

Rejestry nowych zachorowań wykazują stałe zwiększanie się, o 5-8% rocznie, nowych przypadków cukrzycy typu 1 [10, 11]. Wzrost zachorowalności dotyczy dzieci we wszystkich grupach wiekowych, a ostatnio obserwuje się szczególnie częste zachorowania w wieku przedszkolnym (poniżej 5 r.ż.) [12]. Badania epidemiologiczne ostatnich lat wykazują, że u dzieci, zwłaszcza powyżej 10. roku życia (30-60%), stwierdza się coraz częściej także inne postaci cukrzycy [13].

W literaturze coraz częściej poruszane jest zagadnienie dotyczące zachorowań na cukrzycę typu 1 u ludzi dorosłych (LADA – *latent autoimmune diabetes in adult*) [14]. Postać ta dotyczy najczęściej osób w wieku 35-60 lat, często stwierdza się w wywiadzie rodzinnym obecność chorób autoimmunologicznych lub cukrzycy typu 1. Charakterystyczne jest u tych chorych nie występowanie otyłości oraz szczególnie częsta obecność przeciwciał anty GAD (*glutamic acid decarboxylase antibodies*). U podłoża tej postaci cukrzycy leżą zjawiska autoimmunologiczne.

Ze względu na bardzo duży wzrost zachorowań na całym świecie cukrzyca jest uważana obecnie za chorobę społeczną [15]. Przyczyny tak dużego wzrostu zachorowań w ostatnich latach nie zostały do tej pory ostatecznie wyjaśnione. Nadmierne spożywanie tłuszczów zwierzęcych i węglowodanów, prowadzące do otyłości (zwłaszcza trzewnej), spożywanie żywności wysoko przetworzonej z konserwantami oraz siedzący tryb życia, najprawdopodobniej leżą u podłoża lawinowo narastających zachorowań na cukrzycę typu 2.

1.1.2. *Niektóre czynniki patogenetyczne cukrzycy. Aspekty genetyczne*

Jedną z charakterystycznych cech cukrzycy jest różnica w liczbie zachorowań, w zależności od regionu świata. Dotyczy to zwłaszcza cukrzycy typu 1, która najczęściej występuje u dzieci w krajach skandynawskich. Obserwuje się również inną częstość zachorowań wśród różnych grup etnicznych, np. zamieszkujących Stany Zjednoczone [16, 17]. Fakt ten sugeruje istnienie czynników predysponujących, takich jak czynniki genetyczne oraz związane ze środowiskiem. Zauważono sezonowość nasilenia zachorowań na cukrzycę u dzieci, co może sugerować wpływ pewnych prodiabetogennych stanów inicjujących, zwłaszcza u dzieci z podatnością genetyczną. Obserwacje dotyczące rodzinnego występowania cukrzycy oraz pojawianie się jej u 2/3 bliźniąt jednojajowych potwierdzają także istnienie powiązań genetycznych. Obecność cukrzycy typu 1 w rodzinie jest ważnym wskaźnikiem możliwości rozwinięcia się cukrzycy w przyszłości. Ryzyko wystąpienia cukrzycy u potomstwa, gdy ojciec choruje na cukrzycę typu 1, wynosi 12%, a w wypadku matki 6%. Cukrzyca typu 1 może również wystąpić u 6% rodzeństwa osób z tym rozpoznaniem, podczas gdy w populacji ogólnej ryzyko to wynosi 0,4% [18].

Sposób dziedziczenia cukrzycy typu 1 jest wielogenowy. Loci warunkujące skłonność rodzinną do występowania cukrzycy insulinozależnej znajdują się w obrębie regionów HLA-DR i DQ [19, 20, 21]. Allele DR-3/DR-4/DQ-B1 szczególnie predysponują do ujawnienia cukrzycy. Znajduje się je u 95% chorych na cukrzycę typu 1 [22, 23]. Istnieją doniesienia o roli patogenetycznej genów spoza układu HLA, co potwierdzałoby wielogenowy sposób dziedziczenia tej choroby [24, 25, 26, 27].

Związek wymienionych genotypów HLA, a także ryzyka wystąpienia procesu autoimmunologicznego i powstawania przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom β trzustki nie został jeszcze ostatecznie wyjaśniony. Wiadomo jedynie, że same czynniki genetyczne w cukrzycy nie są w stanie wywołać kaskady zjawisk procesu autoimmunologicznego.

Według licznych badań czynnikami inicjującymi rozwój choroby u osób „podatnych” genetycznie mogą być niektóre infekcje wirusowe. Prowadzono badania dotyczące wirusów występujących często chorób zakaźnych (świnki, odry, różyczki), a także niektórych szczepów enterowirusów [28, 29, 30]. Nadal jednak potrzebne są dalsze obserwacje w tej dziedzinie [31]. Autoimmunologiczny proces niszczenia komórek β trzustki, zapoczątkowany przez infekcję

wirusową, może przebiegać powoli i podklinicznie, stąd trudno o udowodnienie bezpośredniego związku. Do grupy zakażeń zaliczanych do czynników etiologicznych włączono różyczkę wrodzoną oraz wirusa cytomegalii. Addycyjny wpływ czynników genetycznych i środowiskowych, np. działanie uszkodzające enterowirusów na komórki β trzustki, ujawnia się głównie u osób predysponowanych genetycznie (allele HLA-DR i DQ). W procesie autodestrukcji immunologicznej komórek β trzustki biorą udział zarówno elementy odporności komórkowej (makrofagi, limfocyty T oraz cytokiny prozapalne), jak i humoralnej (przeciwciała przeciw wyspom ICA, przeciw insulinie IAA, dekarboksylazie kw. glutaminowego GAD oraz fosfatazie tyrozyny białkowej IA-2). Cytokiny uwalniane przez limfocyty T wywołują apoptozę komórek β trzustki [32, 33].

Istnieją również doniesienia o wpływie szczepień ochronnych u dzieci z ryzykiem genetycznym na inicjację procesu immunologicznego i ujawnienie cukrzycy. Jak dotychczas teorie te nie zostały potwierdzone.

Przeprowadzono także liczne badania dotyczące wpływu sposobu karmienia dziecka we wczesnym niemowlęctwie na rozwój cukrzycy w wieku przedszkolnym. Nie znaleziono jednak korelacji między długością okresu karmienia naturalnego i występowaniem choroby. Jedynym sugestywnym badaniem jest badanie Norrisa i Zieglera, dotyczące wpływu wczesnej podaży produktów zbożowych (przed trzecim miesiącem życia) na występowanie cukrzycy typu 1 u dzieci predysponowanych genetycznie [34, 35].

Hipoteza sformułowana w 1992 r. przez Halesa podkreśla powiązanie niskiej masy urodzeniowej noworodka i zwiększonego ryzyka rozwinięcia w życiu dorosłym cukrzycy typu 2 (szczególnie u osób otyłych). Niedożywienie w okresie życia płodowego powodować ma zmiany metaboliczne, prowadzące do późniejszego nadmiernego gromadzenia tłuszczu. W stanach tych dochodzi do zmniejszenia liczby komórek β w wyspach trzustki i zmniejszenia wrażliwości mięśni szkieletowych na insulinę [36, 37]. Wszystkie te hipotezy nadal oczekują na potwierdzenie.

Ukazuje się coraz więcej doniesień o tym, że niedobór wit. D₃ w czasie ciąży i niemowlęctwa może zwiększać ryzyko rozwinięcia cukrzycy typu 1. Suplementacja wit. D₃ i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 wiąże się z mniejszą zapadalnością na cukrzycę [38, 39, 40].

Opublikowano również teorię o wspólnej patogenezie cukrzycy typu 1 i 2 (teoria „akceleratora”) [41,42]. Autorzy dowodzą, że różnice między dwoma typami cukrzycy polegają jedynie na różnym tempie destrukcji komórek

β . Hiperglikemia może wynikać z autoimmunologicznego procesu niszczenia komórek beta, ich apoptozy lub oporności na działanie insuliny. Wszystkie te zjawiska mogą występować łącznie. Apoptozę komórek wysp trzustki powodują: podatność konstytucjonalna, insulinooporność oraz reakcje autoimmunologiczne. Insulinooporność może nasilać apoptozę komórek beta, prowadzić do uwalniania antygenów i nasilenia reakcji autoimmunologicznej. Czynnikiem niezbędnym do inicjacji tych procesów jest otyłość trzewna, która może być zaznaczona już we wczesnych okresach życia (noworodek, płód) i która generuje insulinooporność [41, 42].

Bardzo szeroko prowadzone badania nad etiologią i patogenezą cukrzycy typu 2 pozwoliły na wyodrębnienie kilku dość dobrze udowodnionych czynników ryzyka. Należą do nich: otyłość, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia gospodarki lipidowej oraz proces starzenia się (duża zachorowalność u ludzi w wieku 60-70 lat). Rozwijający się zespół metaboliczny przyspiesza i nasila powstawanie miażdżycy i jej powikłań. Podobnie jak w cukrzycy typu 1, w rozwoju cukrzycy typu 2 biorą udział czynniki genetyczne. Obserwuje się ewidentnie częstsze zachorowania w rodzinach. Jeśli rodzice nie chorują na cukrzycę to chorobowość ich potomstwa wynosi 6-10%. Przy chorobie jednego z rodziców wzrasta do około 18%, a jeśli chorują oboje możliwość zachorowania wynosi 26% [43, 44].

Dotychczas udowodniono silne związki insulinooporności w cukrzycy typu 2 z polimorfizmem i wariantami genu kalpainy 10 (CAP N10) oraz genu *PPAR* (*peroxisome proliferator-activated receptor*, receptor aktywowany przez czynniki wywołujące proliferację peroksysomów) czynnika transkrypcyjnego biorącego udział w regulacji działania insuliny) [45]. Do dzisiaj interesująca jest, sformułowana przed laty, teoria Pickupa i Crooka, którzy podkreślają rolę czynników zapalnych w patogenezie cukrzycy (model cukrzycy jako „przetrwałej reakcji ostrej fazy”). Zwiększone wydzielanie cytokin zapalnych z tkanki tłuszczowej, pod wpływem bodźców pokarmowych, zapoczątkowuje reakcję ostrej fazy i produkcję białek ostrej fazy w wątrobie. Wyżej wymienione zaburzenia przyczyniają się do hyperlipidemii, hypercholesterolemii i procesów aterogenezy. Niedawno po raz pierwszy poruszono rolę kwasów omega 3 w prewencji rozwoju miażdżycy [37].

W prowadzonych badaniach wykazano, że na ujawnienie się cukrzycy typu 2 znaczący wpływ mają czynniki środowiskowe. Wpływ ten może być nawet większy niż w przypadku czynników genetycznych (odwrotnie niż w cukrzycy

typu 1). Osobnicy z predyspozycjami genetycznymi, zwłaszcza wielogenowymi, są szczególnie podatni na czynniki środowiskowe. Spośród nich największe znaczenie dla ujawnienia się cukrzycy typu 2 ma otyłość.

Związek otyłości i zwiększonego ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 nie został do tej pory ostatecznie wyjaśniony. Najważniejszym czynnikiem predykcijnym, jest wartość wskaźnika masy ciała BMI (*body mass index*) [43], który jest nieprawidłowy u około 80% osób chorujących na cukrzycę ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$). Towarzyszą temu często zaburzenia lipidowe i nadciśnienie tętnicze.

W 1962 r. Neel, a potem Hales [36], próbowali wytłumaczyć częstość nadwagi u tych chorych teorią „ewolucyjną”: cechy genetyczne, które w przeszłości przy ograniczeniu dostępności pokarmu warunkowały prawidłowy metabolizm, w obecnych warunkach cywilizacyjnych i nadmiarze pożywienia oraz braku aktywności fizycznej przyczyniają się do rozwoju cukrzycy (teoria „oszczędnego genotypu” – *thrifty genes*). Teoria ta jednak nie wyjaśnia ostatecznie mechanizmu współczesnego, lawinowego narastania częstości występowania otyłości. Stopień zagrożenia cukrzycą nie zależy jednak tylko od ilości tkanki tłuszczowej w organizmie, ale także od jej rozmieszczenia.

Insulinooporność w sposób szczególny towarzyszy otyłości trzewnej (brzuszej, androidalnej). Tkanka tłuszczowa jamy brzusznej wykazuje podwyższoną aktywność fosfataz tyrozynowych (PTP1B – *protein-tyrosine phosphatase 1B*), co powoduje jej zwiększoną oporność na insulinę. Enzym ten jest modulatorem wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałów insuliny, a jego aktywność jest ściśle powiązana z BMI [47]. Tkanka tłuszczowa przejawia także działanie wewnątrzwydzielnicze, wytwarza adipocytokiny (leptyna, TNF- α , IL-6, TGF- β i in.) przyczyniające się do powstawania insulinooporności, a także powikłań w przebiegu cukrzycy [48].

Ważną rolę w rozwoju zespołu metabolicznego odgrywają wolne kwasy tłuszczowe FFA (*free fatty acids*). U osób z otyłością ich poziom w surowicy krwi jest podwyższony (aktywność lipolityczna tkanki tłuszczowej trzewnej). Nadmierna mobilizacja kwasów tłuszczowych powoduje ich zwiększony transport do wątroby i zmniejszenie wiązania insuliny przez receptory komórek wątrobowych (teoria wątrobowa) [49]. Wysokie stężenie FFA i zwiększony ich napływ do wątroby przyczynia się także do powstawania insulinooporności. Wydzielane przez tkankę tłuszczową adipocytokiny odgrywają rolę w regulacji procesów metabolicznych i mogą mieć wpływ na rozwój miażdżycy. Większość z nich (za wyjątkiem adiponektyny) sprzyja aterosogenezie.

Poza otyłością brak aktywności fizycznej jest drugim ważnym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju cukrzycy. W wielu szerokich opracowaniach stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2 a nasileniem aktywności fizycznej. Jest ona jednym z najważniejszych czynników protekcyjnych, ponieważ poprawia tolerancję glukozy i zwiększa wrażliwość na insulinę [50].

Mimo ogromnego postępu wiedzy na temat etiopatogenezy cukrzycy, dostępności nowych technik badawczych w zakresie biologii molekularnej i genetyki, pytanie dotyczące przyczyny występowania insulinooporności w cukrzycy typu 2 jest nadal aktualne. Wrażliwość na insulinę jest uwarunkowana genetycznie, a możliwość wystąpienia zaburzeń molekularnych dotyczy może każdego etapu, skomplikowanych procesów związanych z aktywnością insuliny w ustroju. Najczęściej spotykane defekty genetyczne dotyczą receptora insuliny i glukokinazy. Mutacje mając wpływ na cząsteczkę insuliny występują sporadycznie. Liczne badania *in vitro* wykazały, że w cukrzycy typu 2 insulinooporność dotyczy wszystkich narządów i tkanek będących celem jej działania [51, 52].

1.1.3. Powikłania cukrzycy

Głównym czynnikiem powodującym uszkodzenie tkanek i wystąpienie przewlekłych powikłań w cukrzycy jest nasilenie i czas trwania hiperglikemii. U niektórych pacjentów, mimo braku wyrównania metabolicznego i wysokich poziomów glukozy we krwi, skłonność do powikłań jest mniejsza, u innych występują one już bardzo wcześnie (skłonność osobnicza).

Wprowadzanie do terapii nowych leków i programów leczenia przyczyniło się do znacznego zmniejszenia śmiertelność spowodowanej **ostrymi powikłaniami** niewyrównania cukrzycy (śpiączka hiper- i hipoglikemiczna), natomiast jej **powikłania późne** w postaci mikro- i makroangiopatii, a zwłaszcza neuropatii, stanowią nadal istotny problem kliniczny [53].

1.1.3.1. Powikłania naczyniowe

Powikłania zależne od hiperglikemii dotyczą głównie naczyń. Wiadomo że prawidłowe leczenie cukrzycy i uzyskanie normoglikemii może zmniejszać nasilenie powikłań naczyniowych lub opóźniać czas ich wystąpienia, ale im całko-

wicie nie zapobiega. Oprócz zwiększonego poziomu glukozy we krwi pełnią tu destrukcyjną rolę istniejące zaburzenia metaboliczne, jak hiperinsulinemia, hiperlipidemia, podwyższony poziom końcowych produktów glikacji, a zwłaszcza nieprawidłowy przepływ krwi przez małe naczynia [54, 55]. Inne potencjalne czynniki ryzyka uszkodzenia naczyń w cukrzycy to nadciśnienie, dyslipidemia, otyłość [56]. Pod wpływem wszystkich tych zaburzeń światło naczyń ulega zwężeniu, a w końcu zamknięciu. Dochodzi również do zwiększonej przepuszczalności naczyń dla białek surowicy oraz zwiększenia ich aktywności skurczowej [57].

Drobne naczynia kłębków nerkowych i siatkówki oka oraz naczynia zaopatrzące nerwy (*vasa nervorum*) ulegają uszkodzeniu najwcześniej, a ich błona podstawna ulega hipertrofii. W naczyniach kłębków nerkowych, na skutek wzrostu poziomu czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ – *Transforming growth factor beta 1*), dochodzi do zgrubienia błony podstawnej, powstawania złogów białkowych, (kolagen, fibronektyna, laminina) i zwiększenia ich przepuszczalności (mikroalbuminuria). Zmiany w *vasa nervorum* są odpowiedzialne także za rozwój neuropatii cukrzycowej (niedotlenienie neuronów). Tkanka nerwowa jest szczególnie podatna na niekorzystny wpływ wysokich poziomów glikemii, ponieważ transport glukozy do wnętrza jej komórek jest tu niezależny od obecności insuliny [58].

Patomechanizm rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy nie został dotychczas ostatecznie wyjaśniony. W chwili obecnej przyjmuje się, że u podstaw mechanizmów biochemicznych uszkodzenia tkanek w hiperglikemii leżą:

- stres oksydacyjny (uszkodzające działanie wolnych rodników).
- włączenie do procesów metabolicznych „szlaku poliowego” – powodującego wzrost stężenia sorbitolu oraz nadmierną mobilizację kofaktorów reakcji tego szlaku (fosforany dwunukleotydów nikotynoaminoadeninowych NAD), którym przypisywana jest pośrednia rola destrukcyjna (zaburzenie reakcji redukcji glutationu).
- nadmierna aktywacja kinazy białkowej C PKC (*protein kinase C*) powodująca wzrost syntezy cytokin, substancji o działaniu zwężającym naczynia, czynników wzrostu śródbłonna.
- upośledzający wpływ końcowych produktów glikacji AGE (*advanced glycation end products*) na funkcję niektórych białek.
- wzrost aktywności przemian metabolicznych drogą szlaku heksozaminowego [59].

Hiperglikemia odgrywa również istotną rolę w patogenezie uszkodzenia dużych naczyń – ryzyko makroangiopatii wzrasta już w okresie nieprawidłowej tolerancji glukozy.

Poza hiperglikemią, do czynników ryzyka makroangiopatii należą dyslipidemia – zwiększony poziom trójglicerydów i lipoprotein o małej gęstości VLDL (*very low density lipoproteine*), która prawdopodobnie ma znaczenie szczególnie na początku rozwoju zmian oraz nadciśnienie tętnicze przyczyniające się wraz z hiperglikemią do szybkiej progresji miażdżycy [60]. Udowodniono korzystny wpływ statyn na zmniejszenie zaawansowania zmian naczyniowych w cukrzycy [61].

Najnowsze badania wykazały wpływ podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi chorych z cukrzycą na procesy destrukcyjne w naczyniach. To zagadnienie jest przedmiotem intensywnych badań [62].

W inicjowaniu procesów aterogenezy w cukrzycy bardzo dużą rolę odgrywa zapalenie, które „przygotowuje” śródbłonek naczyń do powstawania nawarstwiających się blaszek miażdżycowych. Manifestuje się to wzrostem markerów stanu zapalnego (CRP, TNF- α , IL-6). Obecnie uważa się, że z wyżej wymienionych czynników końcowe produkty glikacji białek (AGE) i stres oksydacyjny odgrywają istotną rolę w rozwoju zarówno mikro- i makroangiopatii [63, 64].

U chorych na cukrzycę choroby serca i naczyń wywołane miażdżycą (np. choroba niedokrwienna serca) występują kilkakrotnie częściej niż w całej populacji [65]. Szczególnie nasilone są zmiany zwapniające w blaszkach miażdżycowych naczyń serca [66]. Częściej też występują w tej grupie chorych udary mózgu i niedokrwienie kończyn dolnych.

Badania ostatnich lat sugerują, że kalcyfikacja naczyń w cukrzycy, nasilona zwłaszcza w neuroosteoartropatii Charcota-CN (*Charcot neuroosteoarthropathy*), może być powiązana z nieprawidłową funkcją niedawno odkrytej osi metabolicznej OPG/RANK/RANKL [67, 68, 69, 70]. Dotyczy to zarówno zmian w kompleksie *intima media* naczyń, jak i procesu kalcyfikacji blaszek miażdżycowych. W związku ze zmianami w naczyniach wieńcowych obecnością neuropatii wegetatywnej oraz zaburzeniami metabolicznymi w komórkach mięśnia serca w cukrzycy, u pacjentów rozwijać się może rozległa kardiomiopatia. W proces ten zaangażowana jest również neuropatia wegetatywna [71].

Wystąpienie powikłań naczyniowych w cukrzycy zależy nie tylko od czasu trwania choroby, stopnia towarzyszącej hiperglikemii, ale również od osobni-

czych skłonności, u podłoża których najprawdopodobniej leżą czynniki genetyczne [53, 55, 65].

Do tej pory najsilniejsze powiązania genetyczne wykazano między hiperglikemią a uszkodzeniem naczyń nerek i serca. Powikłania te często występują wśród członków jednej rodziny [53, 54]. Wykazano również związek między nefropatią w cukrzycy a polimorfizmem genu konwertazy angiotensyny [72]. Ryzyko wystąpienia autonomicznej neuropatii układu sercowo-naczyniowego stwierdzano częściej u osób z fenotypem HLA-DR 3/4 [73]. Zauważono ponadto u chorych na cukrzycę występowanie pewnej korelacji między powikłaniami ze strony nerek oraz zapadalnością na chorobę wieńcową [74].

1.1.3.2. Neuropatia

Neuropatia jest bardzo częstym powikłaniem cukrzycy. Jeszcze nie tak dawno uważano, że cukrzyca jest skutkiem, a nie przyczyną uszkodzenia systemu nerwowego. Konsensus w sprawie neuropatii cukrzycowej ustalono w 1988 r. na konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego w San Antonio. Stwierdzono, że neuropatia cukrzycowa to zaburzenia czynności nerwów obwodowych (neuropatia obwodowa) w przebiegu cukrzycy, które nie mogą być wytłumaczone innymi czynnikami przyczynowymi [75].

Według opublikowanych wyników różnych badań epidemiologicznych, liczba przypadków neuropatii obwodowej wśród chorych na cukrzycę wynosi 5-60%. Tak duża rozpiętość wartości wynika przede wszystkim z niejednorodnych kryteriów diagnostycznych [76, 77, 78, 79]. Mimo tych rozbieżności wiadomo jednak z całą pewnością, że po 25 latach trwania choroby cechy polineuropatii stwierdza się u ponad 50% chorych, a częstość jej występowania rośnie z wiekiem [7]. W badaniach Diabetes Control i Complication Trial Group z 1995 r. wykazano u około 25% pacjentów, już po 2-3 latach trwania cukrzycy, istnienie stwierdzalnych badaniem klinicznym nieprawidłowości neurologicznych. Po 8 latach trwania choroby zmiany dotyczyły 40% chorych. Potwierdzono ponadto zależność nasilenia neuropatii od wyrównania zaburzeń metabolicznych i czasu trwania cukrzycy [80, 81]. Do czynników ryzyka neuropatii, poza hiperglikemią należą również wiek pacjenta, występowanie nadciśnienia tętniczego i dyslipidemia [56].

Spośród wszystkich powikłań cukrzycy, uszkodzenie obwodowego systemu nerwowego oraz będące jego konsekwencją zmiany powstające w obrębie stóp, doprowadzające niejednokrotnie do amputacji kończyn, są jedną z głównych przyczyn długotrwałych hospitalizacji oraz inwalidztwa pacjentów [81].

Neuropatia przez dłuższy okres rozwija się podklinicznie. Dochodzi do nagromadzenia sorbitolu wewnątrz neuronu, zmniejszenia szybkości przewodnictwa nerwowego [82].

Istnieją różne podziały neuropatii. Uwzględniają one różne czynniki etiologiczne, lokalizację zmian, ich dynamikę oraz objawy kliniczne. Najczęściej stosuje się klasyfikację Tomasa [83], a w naszym kraju dla celów klinicznych klasyfikację wg zaleceń Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego z 2006 r. [79]. Wyróżnia ona polineuropatię uogólnioną symetryczną (czuciową, czuciowo-ruchową i autonomiczną) oraz neuropatię ogniskową i wieloogniskową.

Etiopatogeneza zmian w układzie nerwowym w cukrzycy nie została dotychczas całkowicie wyjaśniona.

Pierwotnym czynnikiem sprawczym jest na pewno hiperglikemia oraz zmiany w neuronie wywołane poprzez nadmiar glukozy dostającej się do jego wnętrza bez udziału insuliny (w ilości proporcjonalnej do zawartości w osoczu). W tej sytuacji przemiana glukozy dokonuje się poprzez szlak poliowy (aktywacja reduktazą aldozową) z kumulacją sorbitolu oraz fruktozy. Ciśnienie osmotyczne wewnątrz neuronu wzrasta i dochodzi do gromadzenia nadmiaru wody [84].

Wewnątrzkomórkowej akumulacji sorbitolu towarzyszy stres oksydacyjny i wytwarzanie nadmiernej ilości wolnych rodników. Na skutek aktywacji szlaku poliowego dochodzi również do zmniejszenia zawartości mioinozytolu w komórce nerwowej, hamowania aktywności ATP-azy sodowo-potasowej, zwiększenia stężenia jonów sodowych oraz obrzęku i destrukcji komórki nerwowej.

Poza wymienionymi czynnikami bardzo istotną rolę odgrywają wspomniane już zmiany w naczyniach doprowadzających krew do neuronów (*vasa nervorum*). Zmiany w *vasa nervorum* poprzedzają zaburzenia ze strony nerwów obwodowych. Neuropatia i zaburzenia mikrokrążenia są ze sobą ściśle powiązane. Wiele badań wskazuje, że neuropatia jest pierwotną chorobą neuronaczyniową, a z drugiej strony sama nasila zaburzenia w mikrokrążeniu. Stwierdzono korelację między zmianami w drobnych naczyniach a nasileniem dysfunkcji neuronów [57].

Zwiększona aktywność kinazy białkowej C (PKC) oraz jej β izoformy (według Brownlee) [85], powoduje skurcz naczyń krwionośnych, głównie drogą

zaburzeń syntezy tlenu azotu przez komórki śródbłonna (tlenek azotu jest ważnym dylatorem drobnych tętniczek). Zwiększa ona także ekspresję czynnika jądrowego NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) nasilając odczyn zapalny drogą generowania cytokin prozapalnych [85, 86]. Aktywacja β izoformy PKC powoduje nadmierny wzrost proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego, co zmniejsza światło vasa nervorum. Niedotlenienie neuronów jest przyczyną wtórnie zwiększonej lipolizy tkanki tłuszczowej, wchodzącej w skład ich osłonek i zwiększenia ilości kwasu linolenowego i arachidonowego. W wyniku ich oksydacji powstaje 4-hydroksynonenal przyczyniający się do apoptozy neuronów [57].

Oprócz zjawisk destrukcji w neuronie, spowodowanych wymienionymi wyżej przyczynami, dochodzi także do spowolnienia regeneracji włókien nerwowych na skutek niedoboru neuronalnego czynnika wzrostu NGF (*nerve growth factor*, czynnik wzrostu nerwu). Istnieje również hipoteza immunologiczna uszkodzenia włókien nerwowych (nadmierne gromadzenie się IgG i IgM). We krwi stwierdzano także pojawianie się przeciwciał antylipidowych [87] uszkadzających składniki lipidowe osłonek nerwowych. Wczesne postaci neuropatii współistnieją często z retinopatią i mikroalbuminurią [76, 88].

Objawy kliniczne dotyczą głównie stóp, co ma prawdopodobnie związek z długością neuronów. Chory może nie zgłaszać żadnych dolegliwości, a ustalenie rozpoznania istniejącej neuropatii wymaga aktywnego postępowania diagnostycznego. W badaniu fizykalnym stwierdza się zaburzenia czucia bólu, a także dotyku, wibracji, temperatury, osłabienie odruchów ścięgniastych oraz deformację stopy.

Postać bolesna neuropatii, przebiegająca z bardzo nasilonymi dolegliwościami w zakresie kończyn dolnych, prawdopodobnie ma nieco inną patogenezę, ponieważ jej przebieg nie jest związany z czasem trwania cukrzycy i jej wyrównaniem. Przeważa tu komponenta zapalna [89]. Z praktyki klinicznej wiadomo, że ustąpienie zmian bólowych wiąże się często z progresją zmian w neuronach czuciowych.

Dolegliwości bólowe, spowodowane neuropatią cukrzycową, występują u około 10% pacjentów. Mogą się one również pojawiać u chorych, u których doszło do nagłej poprawy wyrównania glikemii (tzw. *insulin neuritis*) [90].

Na skutek neuropatii czuciowo-ruchowej dochodzi do zmian architektury stopy i jej deformacji, a zaburzenia czucia prowadzą do niezauważalnych przez chorego mikrourazów. Dołączająca się neuropatia autonomiczna przyczynia się do powstania zmian troficznych skóry (suchość, pękanie naskórka) [91, 92].

Uszkodzenie **autonomicznego układu nerwowego** w neuropatii cukrzycowej dotyczy zarówno części współczulnej jak i przywspółczulnej. Towarzyszy ono zwykle symetrycznej dystalnej polineuropatii aż w 70%. Objawy kliniczne tej postaci neuropatii wyrażone są głównie zaburzeniami czynności serca, ale dotyczą również przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego, termoregulacji. Częstość występowania neuropatii autonomicznej jest oceniana różnie w różnych badaniach – 7,7-40% chorych [76, 92, 93, 94, 95]. W pracach tych badane były najczęściej takie parametry jak: zmienność rytmu serca w czasie intensywnego oddychania i próby Valsalvy, zmienność ciśnienia tętniczego, zaburzenia potliwości, funkcji pęcherza i jelit, zaburzenia czynności źrenic. Badania dotyczyły głównie chorych z cukrzycą z towarzyszącą symetryczną dystalną polineuropatią. Śmiertelność w neuropatii autonomicznej jest duża i wiąże się często z nagłym zgonem (zaburzenia czynności serca – migotanie komór) [96]. W zaawansowanej postaci neuropatia autonomiczna może być powodem zgonu u około 50% chorych [91]. W cukrzycy typu 2, zaburzenia czynności włókien autonomicznych mogą pojawiać się już we wczesnym stadium choroby [97], a nawet wyprzedzać jej rozpoznanie [98]. Częstość występowania neuropatii autonomicznej jest większa w cukrzycy typu 1 [99].

Neuropatia autonomiczna w cukrzycy ma prawdopodobnie podłoże genetyczne. U niektórych pacjentów mimo nasilonych zaburzeń metabolicznych powikłanie to nie występuje. U innych mimo dobrego wyrównania poziomów glukozy we krwi, już po kilku latach trwania choroby stwierdza się cechy uszkodzenia systemu nerwowego [73, 100].

Uszkodzenia włókien nerwowych w cukrzycy są dystalne i dotyczą wszystkich włókien nerwowych.

1.1.3.3. Stopa cukrzycowa

Zgodnie z definicją WHO „zespół stopy cukrzycowej” oznacza występowanie infekcji, owrzodzenia (rany), destrukcji głębokich tkanek z obecnością cech neuropatii i niedokrwienia o różnym stopniu zaawansowania. Zasadniczą rolę w patogenezie zespołu stopy cukrzycowej odgrywa polineuropatia, u wielu chorych pojawia się również niedokrwienie kończyn dolnych. Miażdżycą dotyczy szczególnie naczyń krwionośnych poniżej kolan, a jej nasilenie jest proporcjonalne do czasu trwania choroby.

Zmiany w tętnicach obwodowych u chorych na cukrzycę różnią się od zmian u osób bez hiperglikemii. Pojawiają się onewcześniej, są obustronne i wieloodcinkowe, nie rozwija się krążenie oboczne i dotyczą najczęściej tętnicy piszczelowej i strzałkowej. U osób bez cukrzycy zajęta jest głównie aorta i tętnica udowa [101]. Niedokrwienie stopy objawia się klinicznie brakiem tętna na tętnicach: grzbietowej stopy, piszczelowej tylnej, a niekiedy również podkolanowej. Skóra stopy staje się cienka, nie występuje na niej owłosienie. Z powodu neuropatii u niektórych chorych na cukrzycę nawet w przypadkach znacznego zwężenia naczyń może nie występować ból i chromanie przestankowe.

W przebiegu stopy cukrzycowej można wyodrębnić:

- zespół stopy cukrzycowej neuropatycznej, w którym dominują cechy uszkodzenia układu nerwowego a krążenie jest zachowane
- zespół stopy neuropatyczno-niedokrwiennej z cechami zarówno neuropatii jak i niedokrwienia
- rzadziej obserwuje się występowanie samego niedokrwienia (zespół stopy cukrzycowej niedokrwiennej) [102].

Należy podkreślić że powikłanie to jest najczęstszą przyczyną nieurazowej amputacji kończyny.

U podłoża patologii leży następujący łańcuch nieprawidłowości: neuropatia, zaburzenia czucia, deformacja stopy, upośledzenie ukrwienia, modzele, owrzodzenie, infekcja, martwica doprowadzające do amputacji kończyny. Zaburzenia neurologiczne i pojawiające się zaniki mięśniowe prowadzą do deformacji stopy. Staje się ona podatna na urazy, a zmiana jej architektury powoduje nieprawidłowości rozkładu sił nacisku i sprzyja powstawaniu modzeli. Są to grube nawarstwienia naskórka, które z uwagi na swoją strukturę, mogą powodować uszkodzenia leżących głębiej tkanek i powstawanie owrzodzeń. Deformacja struktury stopy przejawia się między innymi: palcami młoteczkowatymi (zgięcie w stawach międzypaliczkowych), nadmiernym wydrążeniem łuku stopy.

Na skutek często niezauważanych przez chorych urazów powstają rany – sprzyjają im występujące w przebiegu neuropatii zaburzenia chodu, a także współistniejąca retinopatia i pogorszenie ostrości wzroku. Z powodu neuropatii czuciowej pacjenci nie odczuwają żadnych dolegliwości, nie mają świadomości istnienia rany – dochodzi do zakażenia, zgorzeli i amputacji kończyny. Współistnienie niedokrwienia znacznie pogarsza rokowanie [103]. Zmiany patologiczne dotyczą wszystkich elementów stopy: skóry, tkanki podskórnej, mięśni, ścięgien, nerwów, stawów oraz kości. Uszkodzenie układu nerwowego stopy doty-

czy włókien czuciowych, ruchowych, a także autonomicznych [104, 105]. Nieprawidłowości czucia przejawiają się klinicznie zaburzeniami odczuwania wibracji, dotyku, bólu i temperatury. Niekiedy pacjenci skarżą się na nasilone bóle stóp, zwłaszcza nocą (postać bolesna neuropatii).

Reasumując, czynnikami ryzyka wystąpienia powikłania, jakim jest stopa cukrzycowa są: złe wyrównanie cukrzycy, nasilona neuropatia, utrata czucia bólu (bezbólowe mikrourazy), zaburzenie ukrwienia, nieprawidłowa mechanika stopy (deformacja, modzele), obrzęk, nadwaga.

Istotne znaczenie w strategii leczenia ma rozróżnienie stopy neuropatycznej od stopy niedokrwiennej. O rozpoznaniu niedokrwienia decydują takie objawy jak ucieplenie i zmiany troficzne skóry, wyczuwalność tętna, występowanie chromania czy bólów spoczynkowych, oraz badania dodatkowe (USG dopplerowskie i inne). Dolegliwości mogą mieć także charakter mieszany neuropatyczno-niedokrwienno [93].

1.2. Neuroosteoartropatia Charcota

1.2.1. Rys historyczny

U niektórych chorych z obwodową symetryczną dystalną neuropatią dochodzi **do zajęcia procesem chorobowym układu kostnego stopy**. Powoduje to całkowitą destrukcję tkanki kostnej, u podłoża której leży osteopenia, dezorganizację stawów oraz aparatu więzadłowego. Deformacja i niestabilność doprowadza często do owrzodzenia, infekcji i niejednokrotnie kończy się amputacją kończyny [106].

Po raz pierwszy destrukcję układu kostnego towarzyszącą neuropatii w przebiegu chorób wenerycznych opisał w 1703 r. Musgrave i nazwał ten stan *gonorrheal rheumatism*. Kolejne doniesienia ukazały się w pierwszej połowie XIX wieku i dotyczyły początkowo zaburzeń funkcji nerwów obwodowych oraz zmian kostnych w uszkodzeniach rdzenia kręgowego [107].

W 1831 r. J.K. Mitchell (w Filadelfii) opisał zniekształcenie stopy w gruźlicy [108]. Był to pierwszy opis uszkodzenia układu kostnego u chorego z rozpoznaniem neuropatii obwodowej. Zasygnalizował on możliwość destrukcyjnego znaczenia ostrej fazy zapalenia powstającego na skutek nieprawidłowego używania stopy oraz towarzyszących temu mikro- i makrourazów [109]. W 1868 r. Jean Martin Charcot opisał rolę zaburzeń odżywiania kości w przebiegu neuro-

patii w *tabes dorsalis*. Zmiany w obrębie kości i stawów stopy zostały później nazwane neuroosteoartropatią Charcota [110].

Na początku XX wieku badania ukierunkowane były głównie na wyjaśnienie patomechanizmu powikłań kostnych, towarzyszących uszkodzeniom układu nerwowego w kile oraz innych chorobach powodujących neuropatię.

W 1916 r. Elloesser prezentując swoje badania nad przebiegiem uszkodzeń kostno-stawowych w neuropatii podkreślił wagę przypadkowego urazu w powstawaniu dezintegracji stawów i kości stopy.

W 1936 r. Jordan po raz pierwszy powiązał występowanie zmian kostnych z neuropatią obwodową w cukrzycy, a w 1947 r. Bailey i Root opisali już całą serię pacjentów z symetryczną dystalną neuropatią w cukrzycy, powikłaną występowaniem zmian charakterystycznych dla neuroosteoartropatii [111]. W 1955 r. Miller i Lichtman rozwinęli to zagadnienie [112].

W 1966 r. ortopeda S. Eichenholtz opublikował monografię „Charcot Joints”, w której wyodrębnił poszczególne stadia rozwoju choroby (stadium progresji, konsolidacji i stadium rekonstrukcji). Pozwoliło to na lepsze zrozumienie przebiegu klinicznego neuroosteoartropatii, jak również zarysowanie strategii operacyjnej jako metody leczenia [113].

Tabela 1. Przebieg historii naturalnej neuroosteoartropatii Charcota
Table 1. Natural history of Charcot neuroosteoarthropathy

Faza ostra		Faza przewlekła	
Stadium 0 – faza prodromalna	Stadium 1 – faza rozwoju	Stadium 2 – faza koalescencji	Stadium 3 – faza rekonstrukcji
obrzęk, miejscowy wzrost ucieplenia, umiarkowany brak lub minimalne zmiany radiologiczne	wydzielanie małych fragmentów kostnych, fragmentacja podchrzęstna, subluksacje, dyslokacje, resorpcja kostna, osteoliza, osteopenia, dezorganizacja struktury kostnej, obrzęk tkanek miękkich	zmniejszenie obrzęku, absorpcja drobnych i fuzja większych fragmentów kostnych, sklerotyzacja kości	dalsza przebudowa kostna i fuzja dużych odłamów kostnych, zmniejszenie sklerotyzacji, zwiększenie gęstości kości
Resorbcja kości		Naprawa	

(na podst. Frykberg R. Charcot foot consensus 2011 prezentacja podczas konferencji DFSG 2012, Poczdam; za zgodą R. Frykberga)

W 1990 r. Shibata zwrócił uwagę na występowanie w przebiegu neurooste-oartropatii Charcota (CN) tzw. stanu prodromalnego, charakteryzującego się występowaniem obrzęku, zaczerwienienia, zwiększonego ucieplenia stopy bez istniejących zmian radiologicznych (tabela 1). Stan ten stwarza ryzyko postawienia mylnej diagnozy np. zapalenia kości, ropowicy, zakrzepicy żylniej i in., co opóźnia wdrożenie prawidłowego postępowania [114]. Dużą wagę wczesnego rozpoznania i możliwości zapobiegania nasilaniu się zmian destrukcyjnych w stopie podkreślił w swojej pracy Johnson [115]. Zalecał on stosowanie specjalnego obuwia i unikanie urazów jako metodę prewencji. Na podstawie badań prowadzonych od 2000 r. i publikacji z tego okresu, przyjęto jako standard pomysłnego rokowania, wczesne rozpoznanie i odciążenie stopy.

W styczniu 2011 r. eksperci zebrani w budynku szpitala La Salpetriere (gdzie w XIX wieku pracował Charcot), ustalili konsensus w sprawie CN oparty na dotychczasowej wiedzy, dotyczący ujednoczenia nomenklatury, patofizjologii, historii naturalnej oraz rekomendowanego leczenia [116]. Zespół ten sformułował następującą definicję: „Neuroosteoartrypatia Charcota, potocznie nazywana stopą Charcota, jest stanem dotyczącym kości, stawów, tkanek miękkich stopy i stawu skokowego, charakteryzującym się wczesną fazą zapalną, rozwijającą się na podłożu neuropatii obwodowej o różnej etiologii. Zaburzeniem pierwotnym jest najczęściej neuropatia czuciowo-ruchowa w przebiegu cukrzycy.” Stwierdzony zespół objawów klinicznych kwalifikuje ten stan do nazywania go zespołem stopy Charcota (*Charcot foot syndrome*) lub neuroosteoartrypatią Charcota (CN – *Charcot neuroosteoarthropathy*)[116].

Jak ustalono dotychczas, w patogenezie tego powikłania istotna jest interakcja następujących czynników : obecność cukrzycy, neuropatii czuciowo-ruchowej, nieprawidłowości metabolicznych dotyczących tkanki kostnej (osteopenia). Powoduje to powstawanie stanu zapalnego, manifestującego się obrzękiem, nasilonym zaczerwienieniem oraz niewielkim, niewspółmierzonym do obserwowanych zmian bólem. Utrzymujące się zapalenie prowadzi do uszkodzeń i złamań, subluksacji, dyslokacji elementów szkieletu stopy i nasilonej jej deformacji.

1.2.2. Epidemiologia

Neuroosteoartropatia Charcota została opisana po raz pierwszy ponad 130 lat temu i nadal pozostaje poważnym i nie w pełni poznanym powikłaniem cukrzycy. Jej definicję, jak już wspomniano, ustalono dopiero w 2011 roku. Około 2/3 pacjentów CN to chorzy z cukrzycą typu 2 [117, 118]. Fabrin i Holstein stwierdzili w swoich badaniach występowanie obwodowej symetrycznej neuropatii u wszystkich pacjentów z CN [119]. W ogólnej populacji chorych na cukrzycę ocenia się że obwodowa polineuropatia dotyczyć może nawet 60% chorych podczas gdy neuroosteoartropatia Charcota występuje u znacznie mniejszej liczby pacjentów [76-79,109,120]. Rozbieżność ta pozostaje dotychczas przedmiotem licznych badań, zwłaszcza genetycznych.

Postępy w leczeniu cukrzycy powodują ogólny wzrost długości i poprawę jakości życia chorych, jednak częstość występowania CN nie ulega zmniejszeniu, a skuteczna terapia nadal pozostaje problemem. U pacjentów z neuroosteoartropatią Charcota mimo leczenia obserwuje się wysoką śmiertelność [121]. Według badań Gazis wynosiła ona aż 44,7% w ciągu 3,7 lat od momentu ustalenia rozpoznania, szczególnie u tych osób, u których utworzyło się owrzodzenie. Ponad 24% obserwowanych chorych wymagało amputacji kończyny [122].

W szerokich badaniach Lavery i wsp.[123] dotyczących patologii w obrębie stóp u osób z cukrzycą, u ponad 8 pacjentów na 1000 badanych stwierdzono ewolucję zmian w kierunku neuroosteoartropatii Charcota w ciągu roku. W innych publikacjach częstość występowania tego powikłania wśród chorych na cukrzycę oceniana jest przeciętnie na około 0,2-0,4% [124]. Niektórzy jednak autorzy [110, 125], podają zakres częstości od 7,5% aż do 29%, a Sanders 0,1-7,5% [126].

Z kolei Armstrong w doniesieniu z 2002 r. ocenił występowanie CN w ogólnej populacji chorych z cukrzycą na 0,16%, a u osób ze szczególnymi czynnikami ryzyka na 13% [127]. Badania epidemiologiczne wykazują nasilającą się w ciągu ostatnich lat częstość tego powikłania.

1.2.3. Czynniki ryzyka

Obserwacje epidemiologiczne wykazały znacznie większą częstość występowania neuroosteoartropatii Charcota u chorych rasy białej, jednak do osta-

tecznego ustalenia etnicznych różnic konieczne są dalsze badania [123]. Potencjalne czynniki ryzyka powstawania CN analizowano w aspekcie wieku, płci, masy ciała (BMI – *Body Mass Index*), czasu trwania cukrzycy i towarzyszącej osteopenii.

Nie wykazano zależności częstości występowania tego powikłania w zależności od płci [117].

Niektóre publikacje donosiły o najczęstszej zachorowalności na CN w wieku 60-70 lat i po okresie około 10 lat trwania cukrzycy [128]. Z badań Sandersa [126] wynika natomiast, że CN występuje najczęściej u osób w wieku ok. 57 lat (50-70 lat). Według doniesień Petrovej [129] powikłanie to dotyczy coraz większej liczby pacjentów w młodym wieku (40 lat), zwłaszcza z cukrzycą typu 1. U pacjentów z typem 2 cukrzycy również obserwuje się przesunięcie zapadalności w kierunku wieku młodszego (50 lat) [129].

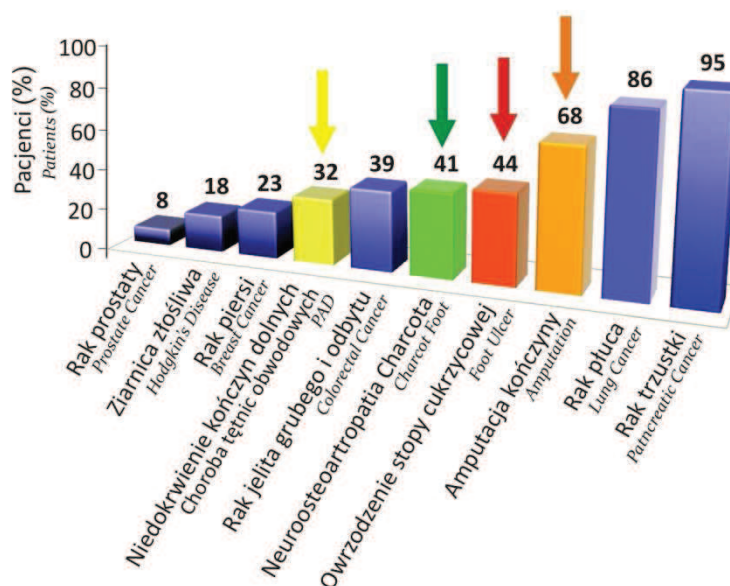
We wielu publikacjach podkreśla się niekorzystny wpływ nadwagi na destrukcję kości w neuroosteoartropatii Charcota. Nadwaga oraz brak odczuwania bólu są ogólnie przyjętymi czynnikami ryzyka występowania tego powikłania [118, 121, 126, 130]. Średni BMI u obserwowanych pacjentów z CN wynosił 34,5 kg/m² [131].

Badania dotyczące wpływu czasu trwania cukrzycy i jej rodzaju (typ 1 czy typ 2), wykazały różnice w powstawaniu CN w różnych typach cukrzycy [131]. U chorych z typem 1 cukrzycy czas trwania choroby do momentu pojawienia się zmian był dłuższy i byli oni młodsi, niż pacjenci z typem 2 cukrzycy. Najkrótszy obserwowany czas trwania cukrzycy do momentu powstania neuroosteoartropatii Charcota to przeciętnie 10 lat [117, 121, 126]. Według innych autorów średnia długość trwania hiperglikemii do czasu wystąpienia zmian kostnych to około 12-15 lat [118, 132, 133].

Wśród wielu czynników predysponujących do rozwinięcia CN szczególnie dużą rolę przywiązuje się do obecności neuropatii autonomicznej [126]. Częstość występowania neuropatii autonomicznej wzrasta z wiekiem oraz czasem trwania cukrzycy i dotyczy to obu typów cukrzycy. Pacjenci z CN i nasiloną neuropatią autonomiczną są narażeni na ryzyko przedwczesnego zgonu. Śmiertelność chorych z tym powikłaniem przewyższa śmiertelność w przebiegu niektórych nowotworów (rycina 1).

U tych pacjentów zmiany w autonomicznym układzie nerwowym mogą pojawiać się we wczesnym stadium choroby [96, 97, 98, 134]. Częstość autono-

micznej neuropatii jest większa w cukrzycy typu 1, co może częściowo tłumaczyć większą liczbę pacjentów z CN w tej postaci choroby [99].



Ryc. 1. 5-letnia śmiertelność w przebiegu różnych postaci zespołu stopy cukrzycowej i neuroosteoartropatii Charcota oraz niektórych nowotworów.

Fig. 1. 5-years mortality in diabetic foot syndrome, Charcot neuroosteoarthropathy and selected cancers. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures, 2000. B. Frykberg, za zgodą.

Zależność między gęstością mineralną kości (BMD – *bone mineral density*) i CN nie jest ostatecznie wyjaśniona. Regionalna osteopenia jest obserwowana u wszystkich pacjentów z CN, jednak mechanizm jej powstawania do chwili obecnej jest dyskutowany. Być może ostatecznie badania dotyczące powiązania osteopenii z miejscowym stanem zapalnym i generowaniem pewnych nowoodkrytych cytokin pomogą w wyjaśnieniu licznych wątpliwości.

Podsumowując: wiek, ciężar ciała, czas trwania cukrzycy, obwodowa neuropatia, a przede wszystkim miejscowa nasilona osteopenia są obecnie ogólnie uznawane za czynniki ryzyka wystąpienia neuroosteoartropatii Charcota.

1.2.4. Przebieg kliniczny

Przebieg kliniczny neuroosteopatii Charcota w cukrzycy jest dość dobrze poznany i jest przedmiotem wielu publikacji [118, 132, 133, 135, 136, 137].

Spośród innych chorób, którym może towarzyszyć CN takich jak: alkoholizm, amyloidoza, poliomyelitis, porażenie mózgowie, wrodzony rodzinny brak odczuwania bólu, trąd, kiła, HIV i syringomyelia obecnie cukrzyca jest najczęstszą przyczyną tego powikłania.

Zmiany dotyczą głównie kości śródstopia i stępu – ta lokalizacja obserwowana jest u ponad 44% pacjentów [126]. Opisywano jednakże i inne miejsca występowania neuroosteopatii w cukrzycy. Destrukcji ulegać mogą inne kości stopy, a także kości stawu skokowego, barkowego, kolanowego oraz nadgarstka [104, 138, 139, 140, 141]. Według badań Pakarinen i wsp. wykonanych u pacjentów z CN, aż 86% zmian obejmowało kości śródstopia, 8,3% staw skokowy, 2,7% kość piętowa [120, 142]. W grupie chorych badanych przez Schona 22% przypadków neuroosteopatii Charcota dotyczyło stawu skokowego, a 59,2% kości śródstopia [143].

Najczęściej zmiany występują jednostronnie [117, 126], jednak Myerson w 1994 r. i Fabrin w 2000 r. opisywali zmiany obustronne u 31% i 17,9% swoich pacjentów [119, 144]. Sinha i Clouse stwierdzili, że patologią zostaje objęta druga stopa w około 20% przypadków [118, 132].

Proces zaczyna się fazą ostrą, której początek jest często związany z przypadkowym urazem lub interwencją chirurgiczną [115, 135, 145]. Współistnienie urazu (często niezauważalnego z powodu ograniczenia czucia bólu) w momencie rozpoczęcia CN stwierdzono u 35% pacjentów [146]. Około 12% zgłaszało w wywiadzie przebyty w ciągu 6 poprzedzających miesięcy zabieg chirurgiczny w obrębie stopy (z różnych przyczyn). Niekiedy rozpoczęcie procesu destruktacji kości wiąże się z istniejącym zakażeniem [147, 148, 149]. Faza ta podtrzymywana jest przez następujące liczne, drobne, niezauważalne urazy. Stopa jest zaczerwieniona, obrzęknięta i tkliwa. Ten okres zapalno-przekrwienno może trwać różnie długo: miesiące, a nawet lata. Dochodzi do nadmiernego napływu krwi do kości stopy. Stają się one osteopeniczne i bardziej podatne na urazy. Powstają liczne złamania i dyslokacje, co w późniejszej fazie procesu potwierdzają badania radiologiczne i scyntygraficzne [150, 151, 152, 153] (ryciny 2-11).



Ryc. 2. Obraz ostrej neuroosteoartropatii Charcota – widoczny obrzęk i zaczerwienienie (materiał własny).

Fig. 2. Acute Charcot neuroosteoarthropathy.



Ryc. 3. Ten sam pacjent kilka tygodni później – widać postępującą deformację okolicy stępu (materiał własny).

Fig. 3. The same patient a few weeks later – progression in midfoot deformity is visible.



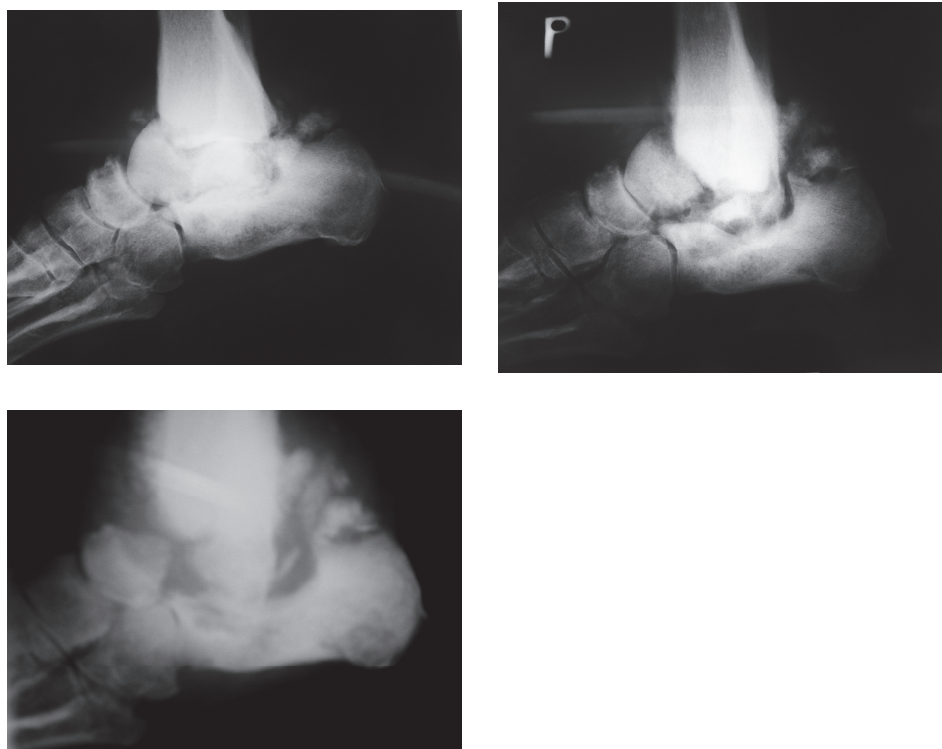
Ryc. 4. Obraz radiologiczny zaawansowanej neuroosteoartropatii Charcota – zniszczenie struktury kości stępu (materiał własny).

Fig. 4. X-ray of advanced Charcot neuroosteoarthropathy – tarsal bones destruction.



Ryc. 5. Nasiloną deformacja stawu skokowego w przebiegu źle rozpoznanej i nieleczonej neuroosteoartropatii Charcota. Czynnikiem wywołującym było skręcenie stawu skokowego (materiał własny).

Fig. 5. Advanced deformity in the course of misdiagnosed and untreated Charcot neuroosteoarthropathy triggered by ankle sprain.



Ryc. 6. Obraz radiologiczny przedstawiający postępującą destrukcję stawu skokowego w neuroosteoartropatii Charcota (materiał własny).

Fig. 6. X-rays showing progressive destruction of the ankle joint in Charcot neuroosteoarthropathy.



Ryc. 7. Nasiloną deformacja stopy w okolicy śródstopia i stępu w przebiegu nieleczonej neuroosteoartropatii Charcota (materiał własny).

Fig. 7. Major deformity of the midfoot in course of untreated Charcot neuroosteoarthropathy.



Ryc. 8. Obraz RTG w najwcześniejszej fazie CN nie wykazuje zmian (materiał własny).

Fig. 8. X-ray of the early stage of Charcot neuroosteoarthropathy shows no abnormalities.



Ryc. 9. Obraz MRI (obraz T1 zależny) – kości klinowata przyśrodkowa i łódkowata o sygnale hipointensywnym (ciemniejsze zabarwienie w porównaniu z obszarami prawidłowej kości) (materiał własny).

Fig. 9. MRI scan (T1 image) – medial cuboid and navicular bones with hypointensive signal (darker areas as compared to healthy bones).



Ryc. 10. Obraz MRI w sekwencji STIR – zajęte kości (klinowata przyśrodkowa i łódkowata) o sygnale hiperintensywnym (jasne). Obraz (B+C) odpowiada obrzękowi szpiku kostnego co łącznie z obrazem klinicznym może świadczyć o obecności neuroosteoartropatii Charcota (materiał własny).

Fig. 10. MRI scan (STIR images)-medial cuboid and navicular bone, with hyperintensive signal (brighter areas). Images 9 and 10 represent bone marrow oedema which along with clinical signs and symptoms may correspond with Charcot neuroosteoarthropathy.



Ryc. 11. Obraz RTG tego samego pacjenta dwa lata później (materiał własny). Widać zmiany o charakterze neuroosteoartropatii o niewielkim nasileniu – leczenie (odciążenie) wdrożone we wczesnej fazie choroby w oparciu o wynik rezonansu magnetycznego było skuteczne.

Fig. 11. X-ray of the same patient two years later show only moderate changes associated with Charcot neuroosteoarthropathy. Early treatment (off loading) introduced on the basis of MRI image was effective.

Należy podkreślić, że obrazy RTG oraz badania scyntygraficzne, zwłaszcza we wczesnej fazie są nieswoiste. Jedynie obraz MRI może wykazać istotę uszkodzenia kości, nasilenie stanu zapalnego, dyslokacje, obrzęk szpiku i mikrołamania [128, 154].

W miarę postępowania procesu chorobowego i narastającej deformacji stopy mogą powstawać owrzodzenia i infekcja. Proces może być powikłany zapaleniem kości, co bardzo pogarsza rokowanie [155].

W końcowej fazie neuroosteoartropatii dochodzi **do całkowitej destrukcji kości**, struktura kostna stopy jest zdeorganizowana, powstają liczne dyslokacje i stawy rzekome. U nielicznych chorych zmiany kostne są niewielkie i zostają wykryte przypadkowo podczas wykonywania zdjęć RTG z innej przyczyny.

Większość autorów w swoich doniesieniach podkreśla, że **wiele przypadków neuroosteoartropatii Charcota pozostaje przez dłuższy czas nierozpoznanych** lub rozpoznanie jest opóźnione. Dzieje się tak na skutek braku jasnych, klinicznych i radiologicznych kryteriów potwierdzających diagnozę we wczesnej fazie choroby [124]. Opóźnienie diagnozy dotyczy aż 25% pacjentów [156]. Rozpoznawana jest często zakrzepica żylna, zapalenie kości, dna moczanowa lub skręcenie stopy [155,157,158]. Brak ustalonego rozpoznania we wczesnej fazie znacznie pogarsza rokowanie.

1.2.5. Rozważania etiopatogenetyczne

Od wielu lat wiadano, że główną rolę patogenetyczną w powstawaniu zmian w neuroosteoartropatii Charcota odgrywa **dysfunkcja układu nerwowego (symetryczna dystalna neuropatia)** i do dziś jest to niezaprzeczalna główna przyczyna sprawcza tej patologii. W niektórych doniesieniach rozważano, czy neuropatia towarzysząca CN różni się od neuropatii u chorych z cukrzycą, u których to powikłanie nie wystąpiło. Young [153] znalazł w swoich badaniach różnice w częstości i nasileniu występowania neuropatii autonomicznej u chorych z CN, a Stevens w nasileniu zaburzeń odczuwania temperatury i czucia bólu [159].

Obecność dystalnej symetrycznej neuropatii stwierdzano we wszystkich opisywanych przypadkach neuroosteoartropatii Charcota.

Brak czucia powierzchniowego i głębokiego (neuropatia sensoryczna), neuropatia motoryczna i autonomiczna, lokalna osteopenia i zwiększone siły naci-

sku działające na stopę to cechy wspólne obserwowane u wszystkich pacjentów z CN [119].

Dystalna symetryczna czuciowa neuropatia była obecna u ponad 100 chorych z neuroosteoartropatią Charcota w badaniach Sinha [118] i w ponad 140 przypadkach obserwowanych przez Clouse [132] i Armstronga [135]. Mimo bardzo dużych zmian anatomicznych, towarzyszącego często owrzodzenia i stanu zapalnego, dolegliwości bólowe u tych pacjentów są bardzo niewielkie. Autorzy zgodnie podkreślają, że brak odczuwania bólu oraz nadwaga (obok różnych innych ważnych czynników patogenetycznych) są decydujące dla szybkości nasilania się zmian destrukcyjnych w układzie kostnym stopy. Symetrycznej neuropatii czuciowej zwykle towarzyszą zaburzenia unerwienia motorycznego. Brak integracji unerwienia małych mięśni stopy prowadzi do przykurczów więzadeł i spontanicznych dyslokacji, a towarzysząca osteopenia do złamań, przy najmniejszym bezbolesnym urazie [136, 160].

Już Charcot sugerował, że „cienkość i łamliwość kości wynika z zaniku funkcji odżywczych, na skutek zaburzeń czynności systemu nerwowego” (teoria neurowaskularno-neurotroficzna). Tę hipotezę powstawania zmian kostnych poparło później wielu badaczy [161, 162]. Stwierdzono, że podatność kości na złamanie jest spowodowana głównie nieprawidłowym, zwiększonym dopływem krwi, który powstaje na skutek zaburzenia czynności włókien autonomicznych (zaburzenia wazomotoryczne) [163]. Uszkodzenie włókien sympatycznych doprowadza do przekrwienia, przyczyniającego się do resorpcji kości i osteopenii. W powstawaniu dysfunkcji układu sympatycznego dużą rolę pełnią niektóre cytokiny [164].

Schwarz i wsp. [165] opisali nasilone zmiany w kościach w następstwie wykonywanej z różnych przyczyn sympatektomii. Tętniczki doprowadzające krew do kości stopy mają obfite unerwienie sympatyczne i sympatektomia powoduje ich trwałą dylatację, po której obserwowano nasilenie zmian kostnych [149]. Potwierdziły to badania Martina [161] i Watkina [162], którzy stwierdzili, że uszkodzenie włókien sympatycznych jest jednym z najwcześniej występujących uszkodzeń neuronu. Fagius [166] zaobserwował ten rodzaj uszkodzenia u 64% pacjentów, a Archer [167] badając przepływ krwi w stopach u pacjentów z cukrzycą potwierdził osłabienie również czynności wazokonstrykcyjnej, co jest bezpośrednim powodem przekrwienia.

Wzmocniony przepływ tętniczo-żylny w CN udowodniony został także w innych badaniach i potwierdzony przez Boultona [168], który zaobserwował

zwiększone ciśnienie parcjalne tlenu w naczyniach żylnych kończyn dolnych u osób z neuropatią, w porównaniu z badanymi pacjentami bez neuropatii.

Do przekrwienia dochodzi mimo ewidentnych jednoczesnych zmian w dużych naczyniach (kalcyfikacja). Zwiększone ucieplenie skóry w porównaniu ze zdrową kończyną oraz zawyżenie wskaźnika kostka -ramię (ABI – *ankle brachial index*) – wynikające z kalcyfikacji naczyń u wszystkich badanych pacjentów z neuroosteopatią Charcota stwierdzili Purewall i Young [137, 153].

Ward [169] wykazał, że mimo stwierdzonego ogólnie zwiększonego napływu krwi do chorej kończyny, dochodzi do zmniejszenia perfuzji przez naczynia włosowate („zespół podkradania”). Zatem mimo dużego napływu krwi nie jest on wystarczający do zaspokojenia potrzeb metabolicznych, co potwierdzili Flynn i Tooke [170]. W miarę trwania ostrej fazy choroby zaczerwienie, obrzęki ucieplenie kończyny stopniowo zmniejsza się.

W przypadku obwodowej neuropatii **napływ krwi wzrasta w obydwu stopach**, co jak wspomniano, spowodowane jest zaburzeniami unerwienia sympatycznego i zmniejszeniem oporu naczyniowego w naczyniach włosowatych. Natomiast **zmiany charakterystyczne dla neuroosteopatii Charcota występują najczęściej jednostronnie**. Mimo intensywnych badań do tej pory jest to najtrudniejsza do wyjaśnienia cecha CN. Shapiro wykazał istotną różnicę w reakcji naczyń u chorych z neuroosteopatią Charcota i inną grupą pacjentów z istniejącą neuropatią oraz w grupie kontrolnej. U chorych z CN oraz w grupie osób zdrowych, miejscowe podwyższenie temperatury powodowało zwiększony przepływ krwi w naczyniach skóry, a w drugiej grupie pacjentów (chorzy z neuropatią bez CN) zjawiska tego nie obserwowano. Autorzy wnioskowali, że utrata reaktywności naczyń oraz zdolności do zwiększenia napływu krwi może chronić przed rozwojem CN [171]. Ukazały się również doniesienia o znacznie większym nasileniu reakcji naczyniowych w odpowiedzi na bodźce temperaturowe u chorych z CN w porównaniu z pacjentami z neuropatią, ale bez tego powikłania [172, 173].

Wiadomo, że **regionalna osteopenia jest podstawowym czynnikiem ryzyka powstawania zmian kostnych w neuroosteopatii Charcota**.

Gdyby założyć słuszność pierwotnych spekulacji Charcota i dalszych badań nad rolą teorii neurowaskularnej w genezie powstawania osteopenii w symetrycznej dystalnej neuropatii [174], **to osteopenia powinna występować obustronnie, a tak nie jest**.

Przebiegowi cukrzycy, nawet niepowikłanej, towarzyszy umiarkowane zmniejszenie gęstości mineralnej kości (BMD – *bone mineral density*). Osteopenia nasila się gdy dołącza się neuropatia [152, 175, 176, 177]. Tendencja do obniżenia BMD wyrażona jest szczególnie u pacjentów z cukrzycą typu 1 [178, 179]. Według niektórych badaczy w cukrzycy typu 1 sam niedobór insuliny i amyliny (IAPP – *islet amyloid polipeptide*), które sprzyjają przyrostowi masy kostnej, doprowadzić może do osteoporozy [180].

Niedostateczny stopień wyrównania cukrzycy również może być czynnikiem ryzyka powstawania zmian kostnych w CN. U młodzieży z cukrzycą typu 1 stwierdzono korelację obniżenia gęstości mineralnej kości BMD z poziomem hemoglobiny glikowanej HbA1c [181]. Może to sugerować, że zła kontrola glikemii, a także redukcja syntezy IGF-1 (*insulin growth factor 1*, insulinopodobny czynnik wzrostu 1) obok innych czynników przyczynia się do powstawania osteopenii. Hyperglikemia wpływa na proces remodelingu kości poprzez glikację kolagenu, modyfikację działania osteoblastów i osteoklastów oraz poprzez powodowanie zwiększonego wydzielania cytokin.

Osteopenię w CN potwierdzają badania radiologiczne. Petrova u swoich pacjentów obserwowała zmniejszony BMD kości piętowej u chorych z neuroosteopatią i dotyczyło to zarówno cukrzycy typu 1 jak i 2. W badaniach tych wykazano, że BMD była zmniejszona także u pacjentów bez CN, ale tylko w cukrzycy typu 1 [182].

Rozważania patogenetyczne skupiały się do tej pory głównie na **teorii neurotraumatycznej** (neuropatia sensomotoryczna: liczne niekontrolowane mikrourazy, amyotrofia mięśni, mikrozłamania, dyslokacje) oraz wspomnianej wcześniej **teorii neurowaskularno-neurotroficznej** (autonomiczna neuropatia, hyperaemia, osteopenia)[183].

Wszystkie wspomniane mniej lub bardziej potwierdzone hipotezy rozwoju CN nie wyjaśniają jednak podstawowych faktów:

1. Jaki jest ostateczny mechanizm powstawania **nasilonej, miejscowej osteopenii** oraz kalcyfikacji naczyń krwionośnych stale towarzyszących neuroosteopatii Charcota?
2. Dlaczego jest to proces **samoograniczający się**? Z biegiem czasu proces zapalny ulega samoistnemu zakończeniu, napływ krwi zmniejsza się, a zdeorganizowana masa kostna ulega sklerotyzacji.
3. Dlaczego zmiany **naczyniowo-kostne są asymetryczne** i dotyczą tylko jednej kończyny, podczas gdy neuropatia w cukrzycy jest sy-

metryczna? Niektórzy badacze próbują tłumaczyć, że być może przyczynia się do tego niejednakowa obustronnie odpowiedź wazomotoryczna na czynniki takie jak np. nieodczuwalne mikrourazy.

4. Dlaczego neuroosteoartropatia Charcota **występuje u pacjentów rzadko**, podczas gdy neuropatia jest najczęstszym powikłaniem cukrzycy?
5. Wobec tego, **którzy z pacjentów** są narażeni na rozwinięcie tego powikłania i dlaczego? Dotychczas nie wykazano bowiem ścisłego, powtarzalnego związku patogenetycznego wystąpienia CN z czasem trwania cukrzycy, jej przebiegiem, wyrównaniem metabolicznym oraz istniejącymi innymi powikłaniami.

Tak więc **mechanizm powstawania rozległych zmian kostnych, a zwłaszcza proces towarzyszącej neuroosteoartropatii Charcota – miejscowej osteopenii nie jest do dziś dostatecznie wyjaśniony.**

W latach 2005-2010 zaczęły ukazywać się doniesienia o tzw. „**teorii zapalnej**”, która może dokładniej niż poprzednie hipotezy wytłumaczyć większość dotychczasowych niejasności, dotyczących powstawania CN. Przywiązuje ona dużą rolę patogenetyczną do toczącego się miejscowo procesu zapalnego i nasilonego wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-1 β , TNF- α i inne [183, 184]. Cytokiny te są znanymi mediatorami resorpcji kości poprzez aktywację osteoklastów [185]. Główna rola zapalenia, jako czynnika etiopatogenetycznego neuroosteoartropatii Charcota, mogłaby tłumaczyć fakt występowania tego powikłania tylko u niektórych pacjentów z neuropatią. Obecnie coraz częściej ukazują się doniesienia, że towarzyszący stan zapalny może być kluczem do wyjaśnienia obserwowanych w neuroosteoartropatii zmian [186].

Ostra faza zapalenia towarzyszy procesowi gojenia mikrourazów (złamania) oraz usuwaniu (liza) fragmentów kostnych w CN (wzrost poziomu TNF i interleukiny 1 β). Unieruchomienie zajętej kończyny powoduje ograniczenie procesu zapalnego i mobilizacji cytokin prozapalnych wraz ze zmniejszeniem przepływu krwi [187].

Zaskakującą cechą charakterystyczną procesu zapalnego w neuroosteoartropatii Charcota jest **rozbieżność między miejscową produkcją cytokin prozapalnych a brakiem odpowiedzi systemowej** (brak gorączki i generowania parametrów stanu zapalnego) [185,188].

Cytokiny prozapalne prowadzą do **wzrostu aktywności niedawno wykrytego szlaku metabolicznego, którego elementami są osteoprotegeryna OPG**

(*osteoprotegerin*), receptor aktywujący jądrowy czynnik kappa B RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*) oraz ligand dla RANK- RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand*). Poznanie plejotropowych funkcji biologicznych w procesie metabolizmu kości oraz w funkcjonowaniu systemu immunologicznego i endokrynnego – wymienionej wyżej osi metabolicznej, pozwala mieć nadzieję na wyjaśnienie większości dotychczasowych wątpliwości dotyczących etiopatogenezy neuroosteopatii Charcota, a zwłaszcza towarzyszącej jej osteopenii [189, 190].

1.2.6. Rola biologiczna osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK

Zaburzenia mineralizacji kości są coraz częściej obserwowane zarówno u dzieci jak i dorosłych. Mogą być one pierwotne i wynikać z patologicznych procesów zachodzących w samej tkance kostnej lub wtórne, towarzyszące jako powikłanie innym patologiom. Zaburzenia mineralizacji kości mogą być także generowane jatrogennie, jako powikłanie stosowanego leczenia [191].

Niszczenie tkanki kostnej towarzyszące chorobom zapalnym, schorzeniom o podłożu autoimmunologicznym, chorobom nowotworowym, cukrzycy i wielu innym stało się podłożem do powstania nowej dziedziny, jaką jest osteoimmunologia. W 2000 r. opublikowano pracę Arron, w której podkreślono ważną rolę układu kostnego w systemie immunologicznym człowieka [192]. Tkanka kostna oprócz swoich funkcji polegających na stanowieniu „rusztowania” ciała, pełni szereg funkcji metabolicznych. Jest ona rezerwuarem związków mineralnych, przede wszystkim wapnia i fosforu.

Wyróżnia się dwa typy tkanki kostnej korową oraz beleczkowatą (kość gąbczasta). Kość korowa cechuje się dużą wytrzymałością mechaniczną, natomiast kość gąbczasta charakteryzuje się bardzo dużą aktywnością metaboliczną. W kości gąbczastej najwcześniej ujawniają się zmiany patologiczne dotyczące metabolizmu kostnego [193].

Przebudowa kości odbywa się w ciągu całego życia, opierając się na dwóch przeciwstawnych procesach metabolicznych – tworzeniu kości i jej resorpcji. Pierwszy z nich zależy od aktywności osteoblastów – pochodzących z wielopotencjalnych mezenchymalnych komórek szpiku. W zjawisku resorpcji kości uczestniczą komórki rekrutujące się z macierzystej komórki hematopoetycznej - osteoklasty [194]. W okresie wzrostu organizmu, jak również w stanach po ura-

zach kości, dominują procesy tworzenia (*modeling*) [195], natomiast przez całe życie toczy się proces przebudowy kości, który ma charakter ciągły (*remodeling*). Zapewnia on utrzymanie prawidłowej struktury kości, jak również homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu [196]. Proces remodelingu polega na zastępowaniu starej kości nową. Rozpoczyna się od resorpcji starej kości przez osteoklasty, co umożliwia powstawanie nowej tkanki dzięki funkcji osteoblastów. Procesy resorpcji i tworzenia kości są ściśle ze sobą powiązane i zachodzą w tzw. podstawowych jednostkach wielokomórkowych tkanki kostnej BMU (*basic multicellular unit*). W sposób proporcjonalny i płynny przebiega proces usuwania starej tkanki kostnej i tworzenia nowej, co zapewnia utrzymywanie jej prawidłowych funkcji w organizmie.

Co 10 lat dochodzi do całkowitej regeneracji szkieletu. Zaburzenia równowagi remodelingu doprowadzają do osteopetrozy (nadmierne tworzenie), osteopenii (przewaga procesów resorpcji) lub osteoporozy. Prawidłowa struktura kości warunkująca spełnianie jej funkcji fizjologicznych zależy od jej gęstości: BMD. Szczytowa masa kostna osiągana w wieku około 30 lat stopniowo zmniejsza się wraz z wiekiem (utrata około 1% w ciągu roku) [197]. Na prawidłową funkcję fizjologiczną układu kostnego wpływa bardzo wiele czynników: aktywność fizyczna, predyspozycje genetyczne, stan hormonalny ustroju, odżywianie, dostępność składników mineralnych, choroby przewlekłe.

Badania procesów zachodzących w układzie kostnym wykazały, że do zainicjowania różnicowania komórek hematopoetycznych w kierunku osteoklastów, konieczny jest bezpośredni kontakt z innymi komórkami tkanki kostnej – osteoblastami [198]. Potwierdzono to w późniejszych badaniach [199]. Poznano wiele pojedynczych czynników o charakterze cytokin lub hormonów inicjujących osteoklastogenezę. Należą do nich: cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*), glikoproteina gp130, czynnik hamujący białaczkę LIF (*leucaemia inhibitory factor*). Zidentyfikowano także tzw. czynnik różnicowania osteoklastów ODF (*osteoclast differentiation factor*), który jest niezbędny w kolejnych stadiach dojrzewania tych komórek [200, 201, 202]. Aktywność osteoklastów regulowana jest także przez różne cytokiny, takie jak IL-1, IL-6, IL-11, CSF (*colony stimulating factor*), PTH (*parathormon*), 1,25 dihydroxywitaminę D₃ oraz kalcytoninę [203]. Zidentyfikowanie receptorów dla estrogenów na osteoblastach [204], sklonowanie i zidentyfikowanie PTHrP (*PTH-related peptide*), jako czynnika odpowiedzialnego za hiperkalcemię w chorobach nowotworowych [205], wykrycie i udowodnienie ważnej roli procesu apoptozy w regulacji liczby osteobla-

stów i osteoklastów [206], miały ważne znaczenie dla pogłębienia wiedzy, szczególnie w zakresie destrukcji kości w różnych stanach chorobowych.

W ostatnich 15 latach dokonał się dalszy ogromny postęp w zrozumieniu skomplikowanych procesów tworzenia i resorpcji tkanki kostnej. Głównym bodźcem do podjęcia intensywnych badań dotyczących biologii kości jest coraz częściej występująca osteoporoza, która została uznana w 1994r. za chorobę cywilizacyjną [207]. Ukazało się bardzo dużo nowatorskich publikacji z tej dziedziny.

Odkrycie w 1997 r. funkcji biologicznej tzw. osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK, jako ostatecznego mediatora osteoklastogenezy stało się ogromnym (określanym wręcz jako rewolucyjny) postępem w znajomości biologii kości.

Zidentyfikowanie i szczegółowe poznanie poszczególnych elementów tego systemu ma ogromne znaczenie dla wytłumaczenia niejasnych do tej pory mechanizmów niszczenia tkanki kostnej w różnych patologiach.

Dotyczy to głównie **osteoporozy** [208], zmniejszenia BMD w toku **leczenia glikokortykoidami** [209, 210, 211, 212], gdzie u pacjentów już po dwóch tygodniach sterydoterapii stwierdzano ewidentne obniżenie poziomu osteoprotekcyjnej OPG, a także **destrukcji kości w niektórych nowotworach** złośliwych. Należą tu głównie szpiczak mnogi, rak prostaty, rak piersi [213, 214, 215] i inne [216, 217, 218]. W tych stanach powstającej osteopenii towarzyszą nieprawidłowości funkcji osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK, co doprowadza do aktywacji osteoklastów i powstawania złamań patologicznych. System OPG/RANK/RANKL uczestniczy również w powstawaniu osteoporozy w **zapaleniu reumatoidalnym stawów** [219].

Odkrycie roli osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK przyczyniło się także do wyjaśnienia mechanizmu destrukcji kości w niektórych chorobach układu kostnego o podłożu genetycznym [203] oraz w przewlekłych stanach zapalnych [220].

Opisano istnienie różnych regulatorów mechanizmu działania tego systemu takich jak: glikokortykoidy, parathormon, czynniki wzrostu, które powodują stymulację RANKL oraz zmniejszające aktywność tej cytokiny (hormony płciowe, kalcytonina, leptyna i in.) [221]. Z innych czynników modulujących aktywność osi OPG/RANKL/RANK należy wymienić tlenek azotu, wolne rodniki tlenowe oraz produkty glikacji (AGE-*advanced glycation end products*) [222].

Aljada opublikował badania, w których udowodnił hamujący wpływ insuliny na aktywność NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) stymulowaną przez RANK [223]. Znajomość tych faktów nie tylko przyczynia się do poznania etiopatogenezy destrukcji układu kostnego w cukrzycy, ale także otwiera nowe perspektywy leczenia osteopenii i osteoporozy (leczenie biologiczne, z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał przeciw RANKL) [189].

Pierwszym dokładnie opisanym elementem omawianej osi metabolicznej była osteoprotegeryna. W 1997 r. Simonet w USA i w 1998 r. Yasuda w Japonii prawie jednocześnie opublikowali doniesienia, w których opisują zidentyfikowaną przez swoje zespoły „nową glikoproteinę uczestniczącą w regulacji gęstości kości”. Ze względu na stwierdzenie jej protekcyjnego wpływu na układ kostny (hamowanie resorpcji tkanki kostnej) glikoproteina ta została nazwana osteoprotegeryną (OPG) [224, 225].

Osteoprotegeryna (synonimy: *osteoclastogenesis inhibitory factor* – OCIF, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B* – TNFRSF11B) jest polipeptydem i należy do rodziny receptorów TNF. Zbudowana jest z 401 aminokwasów o masie 55kDa. Gen kodujący OPG znajduje się w chromosomie 8q24. W jej cząsteczce można wyróżnić strukturalnie trzy grupy aktywnych domen. Pierwsza grupa to domeny bogate w cysteinę (D1-D4), które są odpowiedzialne za wiązanie RANKL i hamowanie osteoklastogenezy. Druga grupa (D5-D6), tzw. domeny śmierci (*death domain*) uczestniczące w transdukcji sygnału dla apoptozy. Domena D-7 ma znaczenie dla wiązania heparyny i procesów dimeryzacji. OPG spośród protein rodziny TNF ma unikalną właściwość przebywania w stanie rozpuszczalnym, dzięki brakowi hydrofobowej domeny międzybłonowej oraz domeny cytoplazmatycznej [190, 226]. W organizmie człowieka występuje w 3 izoformach: w postaci monomeru, dimeru i w połączeniu ze swoim ligandem RANKL. Największe powinowactwo do łączenia się z ligandem ma postać dimeru [224, 227]. OPG unieczynnia efekty biologiczne działania RANKL i jest endogennym antagonistą układu RANKL/RANK. Ma także zdolność wiązania się z TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) [228, 229] znosząc jego działanie przyspieszające apoptozę. OPG przyczynia się tym samym do przedłużenia przeżywalności komórek, co wiązane jest w wielu publikacjach z możliwością jej aktywności w genzie nowotworów [230].

Występowanie mRNA dla OPG stwierdzono w wielu tkankach, między innymi w komórkach układu krwionośnego (serce, tętnice, żyły), szpiku, płucach,

nerkach, śledzionie i in., a także w komórkach dendrytycznych, monocytach, limfocytach i makrofagach [224, 231]. W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień o mechanizmie wpływu OPG na układ kostny [232, 233, 234, 235].

Osteoprotekcyjne działanie OPG dokonuje się drogą hamowania osteoklastogenezy. Dochodzi do tego dzięki zmniejszeniu aktywności związków stymulujących powstawanie osteoklastów (niektóre cytokiny, IL-11, PTH i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) [236, 237]. Głównym jednak mechanizmem jest blokowanie ich dojrzewania poprzez wiązanie się z RANKL, którego OPG jest rozpuszczalnym receptorem [231]. Dzięki związaniu RANKL z OPG zostaje zatrzymana kaskada metaboliczna dojrzewania osteoklastów, do której niezbędna jest aktywacja cytokiny RANK (znajdującej się na ich powierzchni) przez RANKL. OPG ma również wpływ zmniejszający czas przeżywalności osteoklastów, co dokonuje się prawdopodobnie drogą nasilania ich apoptozy [238].

Oprócz wpływu na układ kostny, OPG przejawia również działanie biologiczne na układ endokrynnny oraz immunologiczny.

Dyskutowany jest wpływ OPG na kalcyfikację błony wewnętrznej dużych naczyń [239, 240]. Sugeruje się jej rolę w schorzeniach sercowo-naczyniowych, jednak w jaki sposób układ OPG/RANKL wpływa na naczynia, pozostaje do tej pory przedmiotem kontrowersji [241].

Wiele czynników ma wpływ na poziom ekspresji genu *OPG* i jej syntezę. Stężenie OPG zwiększa się pod wpływem witaminy D_3 , estradiolu, transformującego czynnika wzrostu beta ($\text{TGF-}\beta$), czynnika martwicy guzów alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleukiny-1 (IL-1). Działanie przeciwne przejawiają parathormon (PTH), glikokortykosterydy (GKS), leki immunosupresyjne, prostaglandyna E (PGE) i inne [242]. Osteopenię występującą w toku długotrwałego stosowania leków immunosupresyjnych (glikokortykoidy i cytostatyki), w przewlekłych chorobach zapalnych (choroba reumatyczna) oraz w transplantologii, można wiązać z ich negatywnym wpływem na powstawanie OPG.

Badano związek między stężeniem OPG a płcią, wiekiem, BMD, stężeniem estradiolu, ale wyniki były rozbieżne [243, 244, 245]. Kudlacek [246] stwierdził ewidentny wzrost poziomu OPG u zdrowych mężczyzn i kobiet wraz z wiekiem, ale nie wykazał zależności z wartościami BMD u chorych z osteoporozą, co jest zgodne z doniesieniem Indridason [247]. Yano pierwszy badał wielokrotnie poziom OPG w surowicy (metodą Elisa) u kobiet po menopauzie [248]. Wyniki badań były zaskakujące, ponieważ stwierdzono korelację ujemną stężenia OPG z BMD, a dodatnią z biochemicznymi markerami przemiany kostnej. Biorąc pod

uwagę udowodnioną ochronną rolę OPG w stosunku do procesów destrukcyjnych układu kostnego, badania te interpretowano jako „niewydolność mechanizmów protekcyjnych w osteoporozie”. Inna grupa badaczy nie znalazła żadnego związku między poziomem OPG w surowicy a markerami przemiany kostnej [249]. Szulc i współautorzy określali poziom OPG w surowicy u starszych mężczyzn i stwierdzili jego pozytywną korelację z ilością testosteronu, a negatywną z poziomem PTH. Nie zaobserwowano jednak zależności wartości OPG z BMD [243].

Liczne badania wykazały, że poziom osteoprotegeryny wzrasta z wiekiem i jest wyższy w okresach destrukcji kości (z różnych przyczyn), zwłaszcza u kobiet w okresie menopauzy w porównaniu z mężczyznami. Badania Hofbauera potwierdzają hipotezę o wpływie OPG na regulację procesu tworzenia kości [250], ale zagadnienie korelacji poziomu OPG w surowicy a BMD pozostaje nadal kwestią otwartą.

Mimo rozbieżności pojawiających się w różnych publikacjach, większość autorów podkreśla celowość określania poziomu OPG, jako swoistego biochemicznego markera, przydatnego klinicznie w monitorowaniu i strategii leczenia chorób kości przebiegających z osteopenią [250]. Do oznaczania poziomu OPG w surowicy powszechnie jest używana metoda ELISA [251].

Dalsze badania nad funkcją OPG w ustroju wykazały, że podwyższony poziom tej cytokiny w surowicy może być również wskaźnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Wiąże się to z zaangażowaniem OPG w patogenezę kalcyfikacji błony wewnętrznej naczyń, jak również w powstawanie zwapnień w blaszkach miażdżycowych [65, 67, 252].

RANKL (*receptor activator nuclear factor kappa B ligand*), kolejny element osi metabolicznej, jest glikoproteiną należącą podobnie jak OPG do rodziny białek TNF- α [253]. Jest on identyczny z wcześniej określoną cytokiną TRANCE (*tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine*) [254].

Gen dla RANKL zlokalizowany jest na chromosomie 13q14, a jego ekspresja jest regulowana zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji przez aktywną postać witaminy D₃, niektóre czynniki wzrostu (TGF- β 1, FGF-2), PTHrP, IL-1 i IL-11. Białko to zbudowane jest z 317 aminokwasów, ma masę cząsteczkową 45 kDa. W swojej strukturze zawiera domenę wiążącą się z błoną komórkową i domenę wewnątrzplazmatyczną. RANKL występuje w organizmie w postaci trzech izoform: związany z powierzchnią komórki, w postaci wolnej

(sRANKL) oraz wewnątrzplazmatycznej. Największą aktywność biologiczną wykazuje izoforma związana z błoną komórkową [255].

Ekspresję RANKL stwierdzono na licznych komórkach, takich jak makrofagi, komórki macierzyste szpiku, osteoblasty, proosteoklasty oraz limfocyty T. Jest on ligandem dla RANK, cytokiny będącej aktywatorem czynnika jądrowego NF- κ B, który bezpośrednio prowadzi do różnicowania proosteoklastów w dojrzałe osteoklasty niszczące tkankę kostną. Tak więc RANKL jest czynnikiem aktywującym cały proces dojrzewania osteoklastów i ich przeżywania.

Aktywacja RANK zachodząca poprzez wiązanie się z RANKL jest podstawowym mechanizmem prowadzącym do osteolizy w różnych stanach chorobowych [190,251,256]. Whong i wsp. stwierdzili w swoich badaniach udział RANKL w różnicowaniu limfocytów T oraz rolę w hamowaniu apoptozy komórek dendrytycznych [257]. Zwiększoną ekspresję tej cytokiny stwierdzono w neuropatii, co prawdopodobnie jest związane ze zmniejszoną ilością produkowanych w tych stanach pewnych neuropeptydów, głównie CGRP (*calcitonine gene related polipeptide*), a także kalcytoniny, które mają zdolność do ograniczania aktywności RANKL. Ekspresja genu *RANKL* może być stymulowana przez wolne rodniki, hiperlipidemię, wysoką glikemię oraz AGE [183, 258].

RANKL wykazuje pewną homologię z TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), proteiną indukującą apoptozę. To podobieństwo sugeruje, że OPG może wiązać się z TRAIL (podobnie jak z RANKL), co wpływa na zmniejszenie procesu apoptozy niektórych komórek [259]. Wzajemny stosunek RANKL/OPG ma decydujące znaczenie dla wielu procesów biologicznych, w tym kalcyfikacji oraz niektórych reakcji immunologicznych [260].

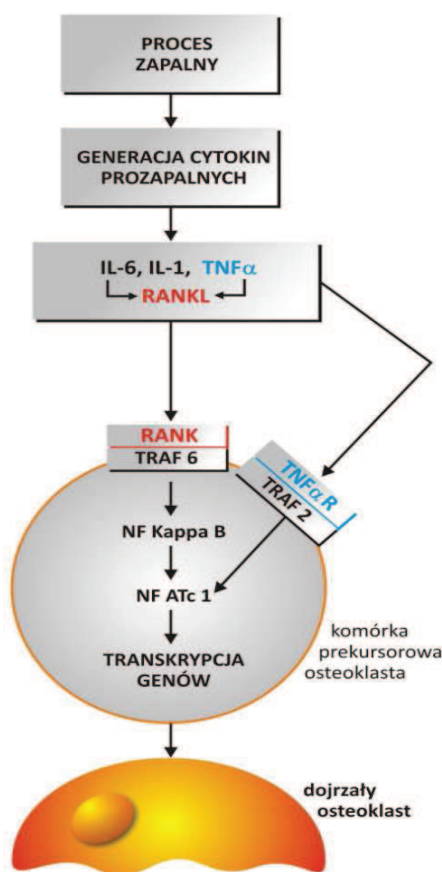
Podobnie jak OPG, postać rozpuszczalną sRANKL oznacza się najczęściej metodą ELISA [261]. Istnieją jednak dość znaczne trudności w jego laboratoryjnym określaniu, toteż w opracowaniach klinicznych częściej się spotyka interpretacje poziomów OPG.

Kolejna cytokina uczestnicząca w aktywnościach biologicznych omawianej osi metabolicznej to **RANK** (*receptor activator nucleus factor kappa B*). Pełni on rolę funkcjonalnego receptora dla RANKL. Jest glikoproteiną składającą się z 616 aminokwasów o masie cząsteczkowej 90 kDa. Gen *RANK* zlokalizowany jest na chromosomie 18q22.1. W budowie proteiny wyróżnić można cztery domeny, w tym zewnątrz błonową i wewnątrzplazmatyczną.

Obecność mRNA genu *RANK* stwierdzono na powierzchni komórek linii makrofagowo-makrocytarnej oraz proosteoklastach, limfocytach T i B, komór-

kach dendrytycznych i fibroblastach, a także w komórkach śródbłonna naczyniowego, wątroby i śledziony [190].

Wzrost ekspresji NF- κ B, którego aktywatorem jest RANK, inicjuje wiele różnych procesów biologicznych. Jednym z nich jest powstawanie OPG, która jest rozpuszczalnym, blokującym receptorem (*decoy receptor*) dla RANKL i neutralizuje efekt jego działania. Badania doświadczalne w grupie myszy pozbawionych genów *RANKL* i *RANK* wykazywały występowanie u nich nasilonej osteopetrozy [262]. Doświadczenia wykazały decydującą rolę tych cytokin dla różnicowania i dojrzewania osteoklastów, a także wpływ na ich apoptozę [238].



Ryc. 12. Schemat uzupełniających się teorii powstawania neuroosteoartropatii Charcota (neurotraumatycznej i zapalnej) z uwzględnieniem roli cytokin osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK.

Fig. 12. Neurotraumatic and inflammatory theories of Charcot neuroarthropathy. The role of OPG/RANKL/RANK pathway.

Proces zapalny – *inflammation*,
 Generowanie cytokin prozapalnych – *production of proinflammatory cytokines*,
 Komórka prekursorowa osteoklasta – *osteoclast precursor cell*,
 Transkrypcja genów – *genes transcription*,
 Dojrzały osteoklast – *mature osteoclast*
 TNF α – czynnik martwicy guza/Tumor Necrosis Factor α
 TNF α R – receptor czynnika martwicy guza / Tumor Necrosis Factor α receptor
 TRAF – czynnik związany z receptorem TNF / TNF receptor associated factor,
 NFATc1 – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T / nuclear factor of activated T-cells,
 NF Kappa B – czynnik jądrowy kappaB/nuclear factor kappaB,
 IL – interleukina / interleukin

Proces łączenia się RANKL z RANK odpowiedzialny za aktywność osteoklastów jest dość złożony (rycina 12).

Rozpoczyna go nasilona produkcja RANKL przez cytokiny prozapalne i inne mediatory zapalenia w miejscu toczącego się procesu zapalnego. RANKL

wiąże się na powierzchni osteoklasta z domeną błonową RANK. Jednocześnie dochodzi do rekrutacji tzw. proteiny adaptorowej TRAF-6 (*TNFreceptor associated factor*) i jej przyłączenia do specyficznych miejsc domeny cytoplazmatycznej RANK. Prowadzi to do aktywacji NFκB, który reagując z promotorem NFAT-c₁ (*nuclear factor of activated T-cells*) powoduje jego amplifikację i transkrypcję genów umożliwiających ukończenie procesu różnicowania osteoklastów.

W miejscu toczącego się procesu zapalnego, oprócz ekspresji RANKL, dochodzi również do generowania zwiększonych ilości TNF, który łączy się także ze swoim receptorem na powierzchni prekursorów osteoblastów. Prowadzi to również do amplifikacji NFAT-c₁ i dojrzewania osteoklastów. Proces ten jest jednak mniej nasilony niż przy przyłączaniu RANKL.

W ostatnich latach zaczęły się ukazywać liczne doniesienia o **podwyższonych poziomach OPG i RANKL w surowicy chorych na cukrzycę typu 1 i typu 2**. Publikowane badania podkreślają zaangażowanie metaboliczne kompleksu OPG/RANKL/RANK w proces destrukcji kości w cukrzycy. Szerokie opracowania Jeffcoate [183] i inne późniejsze doniesienia [124, 263] dotyczące mechanizmów powstawania osteopenii w neuroosteoartropatii Charcota wyjaśniają całą sekwencję procesów metabolicznych z uczestnictwem prozapalnych cytokin RANKL i OPG. Inne publikowane prace w całej rozciągłości są zgodne z tymi doniesieniami [120, 182, 184].

W większości badań poziom OPG jest używany jako marker oceny aktywności systemu cytokin OPG/RANK/RANKL. Pomiar OPG jest technicznie łatwiejszy niż RANKL i to powoduje, że jest częściej oznaczana w badaniach *in vitro* i klinicznych.

Doupis i wsp. w 2009 r. [89] opublikowali doniesienie o podwyższonym poziomie OPG w surowicy u chorych z cukrzycą i obwodowa neuropatią. Blazquez i wsp. [264] udowodnił znamiennej korelację między poziomem OPG a wiekiem, wagą, glikemią i ciśnieniem krwi u pacjentów z cukrzycą. Stwierdził, że poziom OPG może być wskaźnikiem nasilenia procesu uszkodzenia naczyń w cukrzycy [264]. We wczesnej fazie cukrzycy typu 1, Xiang stwierdził zależność między poziomem OPG a kontrolą glikemii [265]. Terekeci [266] obserwował wyższą koncentrację OPG u chorych z typem 2 cukrzycy niż w grupie kontrolnej, a także korelację jej poziomu z obecnością neuropatii [266]. Browner oraz Rasmussen i wsp. [267, 268] badali zależność poziomu OPG od poziomu glikemii, BMD oraz ciśnienia tętniczego u pacjentów z cukrzycą. Stwierdzili ewidentnie podwyższone

wartości OPG, zarówno w typie 1 jak i 2 cukrzycy i ich korelację z wartościami BMD oraz stanem naczyń obwodowych. Liczne doniesienia ukazały się także na temat poziomu OPG i jednoczesnej kalcyfikacji naczyń krwionośnych oraz występowania incydentów sercowo-naczyniowych [269, 270, 271, 272].

1.2.7. **Udział cytokin OPG/RANKL/RANK w patogenezie neuroosteartropatii Charcota**

Spośród licznych niewyjaśnionych patogenetycznie objawów CN największe zainteresowanie badaczy budzi towarzysząca chorobie **miejskowa osteopenia, zmiany w naczyniach (kalcyfikacja), jednostronność obserwowanych zmian** oraz fakt stosunkowej **rzadkości występowania** CN wśród chorych z neuropatią w cukrzycy. Wobec bardzo dużej częstości dystalnej polineuropatii rodzi się pytanie, **którzy pacjenci są narażeni na powstanie neuroosteartropatii Charcota**, a u których mimo nasilonych objawów ze strony obwodowego układu nerwowego to ciężkie powikłanie nie występuje.

Wydaje się, że poznanie funkcji odkrytych w ostatnich latach cytokin działających spójnie w ramach osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK, przyczyni się nie tylko do wyjaśnienia mechanizmu powstawania niewyjaśnionych do tej pory zmian w CN, ale również będzie miało wpływ na wdrożenie przyczynowego leczenia.

Możliwość zaangażowania elementów osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK w patogenezę zapalnej fazy neuroosteartropatii Charcota podkreślał Jeffcoate już w 2004 r. [188]. Sądził on, że znajomość funkcji biologicznych ww. cytokin, a zwłaszcza RANKL, pozwoli na wyjaśnienie wielu „brakujących ogniw” w patogenezie CN. Sugerował, że samo istnienie neuropatii może powodować wzrost ekspresji RANKL, jako efekt zmniejszenia ilości (zależnej od unerwienia) pewnych peptydów antagonistycznych, jak np. kalcytonina [188]. Zaobserwowano ponadto nadekspresję RANKL w różnych stanach przebiegających z degeneracją układu kostnego (osteoporoza menopauzalna i posterydowa, niektóre procesy nowotworowe-spiczak, reumatoidalne zapalenia stawów).

Najnowsza hipoteza wyjaśniająca zmiany patologiczne zachodzące w układzie kostnym (miejskowa osteopenia) w CN, opiera się na koncepcji, że kaskada następujących kolejno patologicznych procesów, w tym aktywacja systemu OPG/RANKL/RANK powstaje w związku z **lokalnym stanem zapalnym** doty-

czącym stopy [220, 273]. W toku zapalenia dochodzi bowiem do zwiększonego wytwarzania różnych cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-1 β , IL-11 w tym RANKL należącego funkcjonalnie do tej grupy. RANKL wiążąc się z RANK doprowadza do aktywizacji czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B), który pobudza powstawanie i dojrzewanie osteoklastów. Rozpoczyna się proces destrukcji układu kostnego (rycina 8).

W toku powstającej osteopenii dochodzi do licznych złamań i dyslokacji. Wzrost poziomu czynnego RANK powoduje jednoczesne formowanie OPG, która wiążąc się z RANKL zapobiega dalszemu stymulowaniu dojrzewania osteoklastów. Lokalny stan zapalny podtrzymywany jest przez stale narastające przekrwienie, powstawanie licznych odłamków i cząstek kruszących się kości. Dochodzi do włączenia procesu remodelingu, lizy i resorpcji małych fragmentów kostnych przez powstające licznie osteoklasty. Brak bólu powoduje, że urazy nie są odczuwane, nie dochodzi do włączenia mechanizmów ochronnych (odruchowego odciążenia kończyny), destrukcja tkanki kostnej stale nasila się, a proces remodelingu jest nieskuteczny.

Narastająca osteoliza, coraz liczniejsze złamania aż do całkowitego zniszczenia architektury stopy tworzą błędne koło:

Neuropatia sensoryczna → zaburzenia czucia → nieodczuwalne mikro-urazy → mikrozłamania i dyslokacje → stan zapalny → produkcja cytokin prozapalnych TNF- α , Interleukina-1 β → stymulacja powstawania RANKL → dojrzewanie osteoklastów → osteoliza, osteopenia → trwające mikrourazy, złamania → stan zapalny i dalsze generowanie cytokin prozapalnych.

Fizjologicznie generowanie tego procesu jest hamowane przez odczuwanie bólu, czego nie ma w neuropatii sensorycznej [274].

O ile osteopenia i powstające złamania w neuroosteopatii Charcota są już patogenetycznie wyjaśnione, o tyle powstawanie dyslokacji i zajęcie procesem chorobowym tkanek miękkich stopy nie jest w pełni jasne. Uważa się, że odgrywają tu rolę głównie nieprawidłowe, niekontrolowane siły nacisku, spowodowane istniejącą neuropatią, całkowita dezorganizacja architektury stopy, jak również proces glikacji więzadeł i ścięgien.

Wiadomo, że niezależnie od postaci cukrzycy, neuroosteopatii Charcota towarzyszy kalcyfikacja ścian naczyń krwionośnych (*intima media*). Według doniesień Psyrogiannis[275] obserwowana jest ona u 20% pacjentów z cukrzycą niepowikłaną i u 40% gdy występuje neuropatia. Kalcyfikacja ścian naczyń wy-

stępuje także w neuropatiach niecukrzycowych, ale jest znacznie mniej częsta. U chorych z CN stwierdza się ją w szczególnie dużym nasileniu w około 80-90% przypadków [118, 132].

Zaobserwowano, że nasilenie kalcyfikacji naczyń w cukrzycy podobnie jak osteolizy jest znacznie większe, gdy jest ona powikłana neuropatią [276, 277, 278]. Szczególnie niekorzystny klinicznie przebieg obserwowano, gdy kalcyfikacja naczyń występuje u pacjentów z nasiloną neuropatią autonomiczną [279].

Udowodniono, że jednocześnie ten sam system metaboliczny, zespół współdziałających ze sobą cytokin OPG/RANKL/RANK uczestniczy zarówno w patogenezie osteopenii, jak i kalcyfikacji naczyń, stanowiąc połączenie między tymi obydwoma procesami [188, 241, 256, 280, 281, 282].

Doherty i Fitzpatrick [65] w swoich badaniach opisują mechanizm kalcyfikacji *intima media* naczyń oraz podkreślają jego odrębność w porównaniu z kalcyfikacją blaszek miażdżycowych. Dyskutują ewentualne determinanty genetyczne tego procesu oraz szczególnie częste jego występowanie w cukrzycy, zwłaszcza przy nasilonej neuropatii autonomicznej. Kalcyfikacja warstwy środkowej dużych naczyń w cukrzycy (*Mönckeberg sclerosis*) przebiega podobnie do procesów ossyfikacji. Być może nieprawidłowości genów OPG lub RANKL – cytokin biorących udział w tym procesie – są odpowiedzialne za nasilenie zmian, szczególnie w neuroosteoartropatii Charcota [65]. W niedawnej publikacji Blasquez [264] uznaje OPG, jako wspólny „klucz” wiążący osteopenię i choroby naczyń w cukrzycy. Podwyższony poziom OPG w surowicy jest predyktorem zmian naczyniowych w tej chorobie [256]. Ueland w swoich badaniach z 2005 i 2011 r. [283, 284] zauważa również predykcyjne znaczenie podwyższonego poziomu OPG w surowicy dla powstawania uszkodzeń serca i naczyń. Udowodnione zaangażowanie mediatorów homeostazy układu kostnego (OPG, RANKL) w kalcyfikację ścian naczyń może stanowić nowy cel interwencji terapeutycznej.

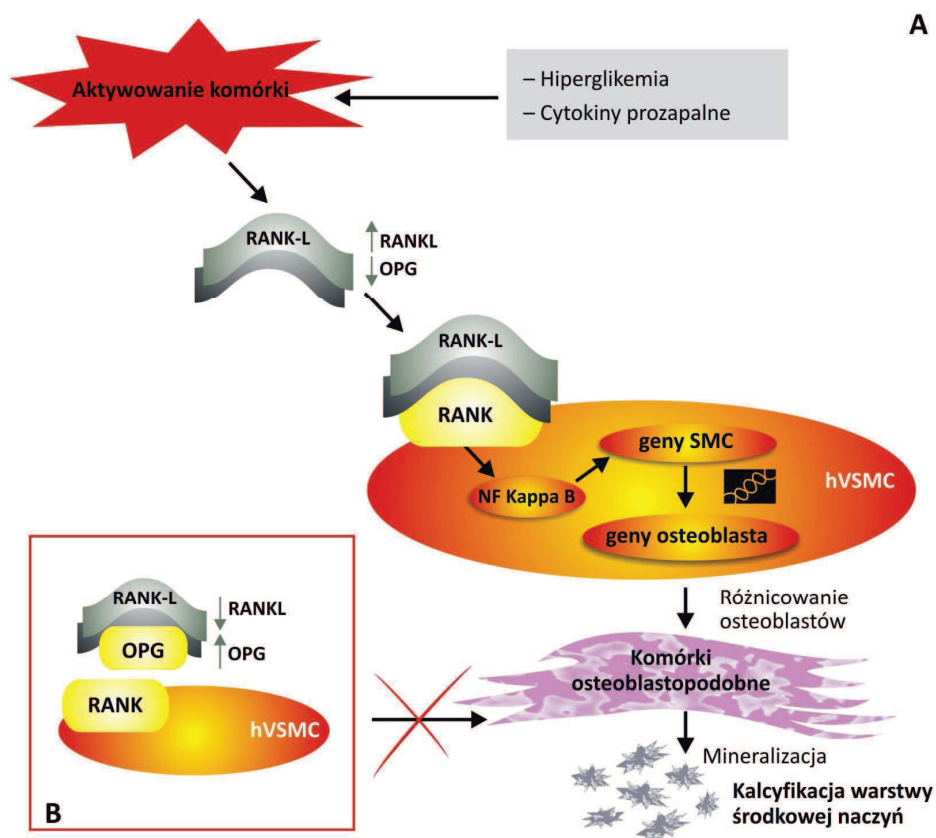
Andersen i Grigoropoulou [252,285] w nowych opracowaniach podkreślają rolę OPG jako markera uszkodzeń serca i fakt szczególnie podwyższonego jej poziomu w CN. Zwiększone ilości OPG i RANKL w surowicy korelują z nasileniem zmian naczyniowych tak ewidentnie, że są one uznanym predyktorem śmiertelności u pacjentów z kalcyfikacją naczyń [228, 284, 286, 287, 288, 289, 290]. Morena [291] określił wartość OPG w surowicy powyżej 757,5 pg/ml jako wartość krytyczną zagrażającą wystąpieniem incydentu kardiologicznego. Kalcyfikacja naczyń w cukrzycy, oprócz zagrożenia incydentem kardiologicznym

(zawał m. serca) i neurologicznym (udar mózgu), wskazuje na zwiększone ryzyko amputacji kończyny [291, 292].

Ndip i Williams [67] przeprowadzili badania eksperymentalne, badając stężenie RANKL i OPG w surowicy pacjentów z neuroosteopatią Charcota z jednoczesną nasiloną kalcyfikacją naczyń. Stężenie RANKL badali również w miejscu toczących się zmian – w naczyniach. Opisali statystycznie znamienne wyższe stężenia RANKL, zarówno w surowicy jak i w miejscu kalcyfikacji naczyń u chorych z CN, w porównaniu z chorymi na cukrzycę z neuropatią, ale bez CN oraz z osobami bez cukrzycy. Autorzy stwierdzili ponadto, iż „dane wynikające z wykonanych badań ewidentnie wykazują, że układ OPG/RANKL/RANK odgrywa rolę w kalcyfikacji naczyń w neuroosteopatii Charcota. Ten zespół cytokin, a zwłaszcza RANKL (szczególnie podwyższony w CN) stanowi główny cel dla wdrożenia nowych metod leczenia”. Mechanizm powstawania kalcyfikacji naczyń w cukrzycy nie jest jeszcze do tej pory całkowicie wyjaśniony [67].

1.2.8. Proponowana sekwencja zdarzeń metabolicznych wyjaśniająca uszkodzenie naczyń w neuroosteopatii Charcota

Bodźce zewnętrzne, jak hiperglikemia, stan zapalny (jako rezultat licznych, drobnych urazów) i inne czynniki, powodują aktywację komórek śródbłonna i osteoblastów do produkcji RANKL. Występuje on w dwóch aktywnych biologicznie, rozpuszczalnych postaciach. Na skutek wzrostu produkcji RANKL podwyższa się wskaźnik RANKL/OPG. RANKL wiąże się ze swoim receptorem RANK, znajdującym się na powierzchni komórek, włączając w ten proces również komórki VSMCs (*vascular smooth muscle cells*) (rycina 13).



Ryc. 13. Schemat mechanizmu kalcyfikacji ścian naczyń (*intima media*) w neuroosteartropatii Charcota (za zgodą A.Ndip). NF kappaB – czynnik jądrowy kappaB, SMC – komórki mięśni gładkich, hVSMC – ludzkie komórki mięśni gładkich.

Fig. 13. Vascular calcification in Charcot neuroosteoarthopathy.

Aktywowanie komórki – *cell activation*, hiperglikemia – *hyperglycaemia*, cytokiny prozapalne – *proinflammatory cytokines*, geny osteoblasta – *osteoblast genes*, różnicowanie osteoblastów – *osteoblasts differentiation*, komórki osteoblastopodobne – *osteoblast-like cells*, mineralizacja – *mineralisation*, kalcyfikacja warstwy środkowej naczyń – *media calcification*

W badaniach Ndip [67] stwierdzono, że RANKL ulega nasilonej ekspresji również *in situ* w wapniejących elementach warstwy środkowej naczyń. Dochodzi do depozycji wapnia i fosforanów w tych miejscach. Badania *in vitro* wykazały, że RANKL zwiększa kalcyfikację VSMCs poprzez aktywację alternatywnej ścieżki metabolicznej, spowodowanej translokacją jądrową NF-κB. Powoduje to różnicowanie się VSMCs w kierunku osteoblastów z następującą depozycją wapnia. Badania potwierdziły, że uszkodzenie naczyń w neuroosteartropatii

Charcota jest niezależne od poziomu wapnia i fosforanów w surowicy. OPG wydaje się zapobiegać jądrowej translokacji NF- κ B i dalszemu różnicowaniu VSMCs. Jeśli poziom OPG jest niski, ale stosunek RANKL/OPG nie jest podwyższony, OPG działa jako receptor wiążący RANKL, zapobiegając dalszej kalcyfikacji VSMCs.

Biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia o roli osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK w powstawaniu osteoporozy u pacjentów z neuroosteoartropatią Charcota, dane eksperymentalne powyższej pracy prowadzą do jednolitej hipotezy powstawania zarówno osteopenii, jak i kalcyfikacji naczyń w przebiegu tej choroby [67].

Analizując dokładnie mechanizm zmian w naczyniach wydaje się, że bardziej właściwym dla niego określeniem jest termin „ossyfikacja”, a nie „kalcyfikacja”, bowiem pierwszym ich elementem jest namnażanie się komórek o potencjale kościotwórczym z komórek prekursorowych (pericyty, VSMCs i inne). Niektórzy badacze podkreślają również zachodzącą w tym procesie pierwotną apoptozę komórek o potencjale kościotwórczym, wywoływaną przez TRAIL. Gdy zaczyna powstawać OPG charakterystyczna dla osteoblastów, dochodzi do zahamowania działania TRAIL (zostaje związany z OPG) i tym samym procesu apoptozy tych komórek [293].

Obserwowany klinicznie związek jednoczesnego występowania neuropatii, nasilonej miejscowej osteolizy i kalcyfikacji naczyń w neuroosteoartropatii Charcota w świetle współczesnych badań może być odniesiony patogeneetycznie do jednego czynnika przyczynowego, jakim jest generowanie prozapalnych cytokin w tym głównie RANKL [185, 188, 282].

Być może, stwierdzenie w przebiegu cukrzycy z towarzyszącą neuropatią szczególnie wysokiego poziomu RANKL, czy OPG w surowicy, będzie uznany ogólnie czynnikiem predykcyjnym możliwości wystąpienia u tych pacjentów neuroosteoartropatii Charcota. Trwają intensywne badania nad tym zagadnieniem. Wszystkie dotychczas opublikowane hipotezy kończą się stwierdzeniem o konieczności prowadzenia dalszych badań doświadczalnych.

Mimo tych osiągnięć nadal jednak pozostaje niewyjaśniony fakt rozwijania się zespołu neuroosteoartropatii Charcota u stosunkowo niewielkiej liczby chorych na cukrzycę, podczas gdy neuropatia, leżąca u podłoża takich zmian w CN jak osteopenia i kalcyfikacja naczyń, jest stwierdzana bardzo często. Niewyjaśnione jest także generowanie przez tych chorych szczególnie wysokich poziomów RANKL i OPG w surowicy [282].

Ostatnie badania prowadzone w schorzeniach kości sugerują, że przyczyną jest tutaj **udział czynników genetycznych** związanych z polimorfizmem genu *OPG* i *RANKL* [65, 294].

1.2.9. Aspekty genetyczne w patogenezie neuroosteoartropatii Charcota

Jak już wspomniano, odkrycie udziału osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK w procesach modelingu i remodelingu układu kostnego spowodowało nasilenie badań nad rolą wymienionych cytokin, przede wszystkim w chorobach wrodzonych kości oraz osteoporozie. Przypuszczano, że zaburzenia funkcjonowania tego układu metabolicznego, związane z nieprawidłowościami genetycznymi mogą być elementem patogenezy osteoporozy i osteopenii. Ukazało się wiele doniesień na ten temat [295, 296, 297, 298].

Wuyts wykazał związek polimorfizmu 445C>T genu *OPG* z chorobą Pageta. Polimorfizm ten może wpływać na zmniejszenie produkcji OPG lub defekt jej czynności i być przyczyną zburzonej równowagi między OPG a RANKL [295]. Ogólnie uważa się, że stosunek dwóch cytokin: RANKL/OPG jest najważniejszy w procesie generowania osteoklastogenezy. Ze względu na potencjalną ochronną rolę OPG w stosunku do tkanki kostnej i ewidentne hamowanie procesu jej niszczenia uważa się, że **gen *OPG* może być genem kandydującym**, mającym wpływ na masę kostną i ryzyko złamań. Badania Langhdall przeprowadzone w Danii na 268 osobach z osteoporozą, dotyczyły polimorfizmów genu *OPG* oraz ich ewentualnego wpływu na ryzyko występowania osteoporozy. Znalezione 12 polimorfizmów dotyczących genu *OPG*, z których trzy wiązały się z osteoporozą i ryzykiem złamań. Były to polimorfizmy 163A>G, 245T>G i 1181G>C. Najsilniejszy związek z BMD i możliwością złamań miały polimorfizmy 163A>G oraz 245T>G [296].

Brandstrom określał polimorfizmy genu *OPG* u osób z osteoporozą w populacji szwedzkiej. Nie stwierdził istnienia związku nieprawidłowości BMD z polimorfizmem 950T>C w regionie promotora tego genu u starszych kobiet [299].

Lee i wsp. [300] w doniesieniu podsumowującym współczesny stan badań nad występowaniem polimorfizmów genu *OPG* a gęstością mineralną kości stwierdzają, że polimorfizm genu *OPG* 1181G>C często towarzyszy zmniejszo-

nemu BMD w odróżnieniu od polimorfizmów 163A>G i 950T>C, które takiej zależności nie wykazują.

Niedawno opublikowane badania Donga i wsp. [301] wykazały obecność licznych polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* u osób ze złamaniami szyjki kości udowej. Autorzy sugerują, że nieprawidłowości genu kodującego *RANKL* ma największe znaczenie dla dynamiki procesu niszczenia kości.

Znacznie mniej doniesień ukazało się na temat powiązań nieprawidłowości genów kodujących *OPG/RANKL/RANK* z kalcyfikacją naczyń. O ile badania dotyczące zwiększonego poziomu *OPG* w surowicy pacjentów z miażdżycą, zawałem i innymi chorobami serca są liczne i wykazują ścisłe powiązanie między poziomem krążącej *OPG* a ryzykiem wystąpienia zawału i innych incydentów sercowo-naczyniowych [267, 283, 302, 303, 304, 305], o tyle pojedyncze tylko prace dotyczą nieprawidłowości genetycznych w tych stanach.

W 2004 r. ukazało się doniesienie Soufi i wsp. [306], w którym opisują współwystępowanie polimorfizmów 950T>C oraz 1181G>C genu *OPG* w łączności z chorobą wieńcową. Badania Ueland [307] nie wykazały zależności pomiędzy polimorfizmami genu *OPG* (163A>G, 950T>C, 1181G>C) a ryzykiem zgonu z przyczyn naczyniowo-sercowych. Podobne spostrzeżenia poczynili Rhee i wsp.[308], którzy również nie znaleźli takiej zależności. Wszyscy autorzy zgodnie potwierdzają konieczność dalszych badań, ponieważ dotychczas obserwowane grupy są niewielkie, co nie pozwala na wyciągnięcie ostatecznych wniosków.

Z przytoczonego wyżej piśmiennictwa wynika, że najliczniejsze doniesienia o możliwości genetycznych przyczyn zaburzeń w remodelingu układu kostnego i kalcyfikacji naczyń dotyczą do tej pory osteoporozy w menopauzie u kobiet, osteoporozy wieku podeszłego, zmian kostnych w chorobie reumatycznej.

Jak chodzi o **próby patogenetycznego powiązania osteopenii i kalcyfikacji naczyń u chorych z cukrzycą i neuroosteoartropatią Charcota – z nieprawidłowościami genetycznymi cytokin *OPG*, *RANKL* i *RANK***, to w dostępnym piśmiennictwie znaleziono jedynie 2 publikacje na ten temat [294, 309]. W 2009 r. Pitocco i wsp.[294] opublikowali doniesienie dotyczące polimorfizmu genu *OPG* i jego związku z występowaniem CN. Badaniu poddano 59 chorych z neuroosteoartropatią Charcota, 41 chorych z cukrzycą bez tego powikłania oraz 103 osoby zdrowe. Autorzy stwierdzili istnienie silnego związku między obecnością polimorfizmów genu *OPG* – 1181G>C zlokalizowanym w 1 eksonie i 245T>G w regionie promotora a występowaniem CN. Fakt ten mógłby potwierdzać pogląd, że nieprawidłowości genetyczne są dodatkowym czynnikiem ryzyka (poza cukrzycą i neuro-

patią) powstawania u chorych neuroosteoartropatii Charcota. Polimorfizm w 1 eksonie genu *OPG* może powodować zaburzenia jakościowe syntezy OPG, natomiast zmiany w regionie promotora – nieprawidłowości ekspresji tej cytokiny (zaburzenia ilościowe). Niekontrolowany poprzez OPG wzrost poziomu RANKL staje się w takiej sytuacji bezpośrednią przyczyną resorpcji kości i powstającej osteopenii (zwiększenie wskaźnika RANKL/OPG).

Podobne badania u chorych z CN wykonano w naszym ośrodku. W pracy opublikowanej w roku 2012 [309] opisano występowanie polimorfizmu genu osteoprotegeryny u chorych z neuroosteoartropatią Charcota u pacjentów z neuropatią bez CN oraz w grupie osób zdrowych. Ocenie poddano częstość występowania w poszczególnych grupach polimorfizmów w pozycji 6890 A>C, 1217C>T, 1181G>C, 950T>C oraz 245T>G. Wyniki badań potwierdziły obserwacje grupy Pitocco odnośnie statystycznie istotnej większej częstości występowania poszczególnych alleli w pozycji 245 pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią Charcota a chorymi tylko z neuropatią. Podobna korelacja dotyczyła polimorfizmu 1217 C>T. W populacji polskiej zarówno dla 1217 C>T jak i 245T>G istniała dodatnia korelacja pomiędzy genotypem TT a występowaniem neuroosteoartropatii. Może to sugerować uczestnictwo czynników genetycznych w etiopatogenezie neuroartropatii Charcota.

Ze względu na jeszcze dość małe grupy chorych z CN włączonych do dotychczasowych badań genetycznych, niezbędne jest ich kontynuowanie na szerszym materiale klinicznym. Ostateczne potwierdzenie założonej hipotezy pozwoliłoby wyjaśnić nie tylko mechanizm powstawania osteopenii i kalcyfikacji naczyń w neuroosteoartropatii Charcota, ale również fakt stosunkowo rzadkiego występowania tego powikłania, ponieważ dotyczyłoby ono osób z predyspozycjami genetycznymi. Stworzyłoby także możliwość przewidywania, u których pacjentów istnieje ryzyko rozwoju CN, a co za tym idzie umożliwiłoby wdrożenie postępowania prewencyjnego, szybsze ustalenie diagnozy i zastosowanie odpowiedniej celowanej terapii.

1.2.10. Diagnostyka neuroosteoartropatii Charcota

Z uwagi na wysokie ryzyko rozwoju deformacji, a w konsekwencji amputacji kończyny w przebiegu artropatii Charcota oraz fakt, że tylko wczesna interwencja i włączenie właściwego postępowania stwarza szansę na uniknięcie

zniekształcenia struktur stopy, jak najszybsze postawienie właściwej diagnozy odgrywa bardzo ważną rolę i często decyduje o dalszych losach zajętej procesem chorobowym kończyny. Diagnostyka CN w jej wczesnej fazie jest trudna.

Rozpoznanie neuroosteoartropatii Charcota w jej początkowym okresie opiera się głównie na objawach klinicznych, do których w fazie ostrej należą: jednostronny obrzęk, zaczerwienienie i wzrost ucieplenia zajętej stopy, którym najczęściej – pomimo współistniejącej neuropatii – towarzyszy niewielki ból. Różnica temperatur pomiędzy stopą zajęta a zdrową w fazie ostrej wynosi powyżej dwóch stopni Celsjusza, średnio około 4,9°C [310, 311].

Do obrazu klinicznego CN należy stała obecność neuropatii oraz brak niedokrwienia (zwykle bardzo dobrze wyczuwalne tętno na tętnicy grzbietowej stopy). Początkowe objawy ostrej neuroosteoartropatii Charcota wymagają różnicowania z innymi schorzeniami, mogącymi manifestować się obrzękiem i miejscowym wzrostem temperatury, takimi jak: napad dny moczanowej, zapalenie stawów, zakrzepica żył głębokich, uraz, zapalenie kości, a w przypadku współistniejącego owrzodzenia również stan zapalny tkanek miękkich i kości. W procesie różnicowania konieczne jest zbadanie poziomu kwasu moczowego w surowicy krwi, białka CRP (*C-reactive protein*) oraz leukocytozy w celu wykluczenia bakteryjnego stanu zapalnego. Celowe jest również wykonanie USG dopplerowskiego układu żylnego.

Różnicowanie ostrej neuroosteoartropatii Charcota, bakteryjnego stanu zapalnego tkanek miękkich i kości może być trudne (szczególnie w przypadku współistnienia owrzodzenia) z uwagi na fakt, że prawie u połowy chorych na cukrzycę mogą nie występować uogólnione objawy zapalenia takie jak gorączka, podwyższenie leukocytozy, OB lub CRP. Dotyczy to nawet przebiegu poważnych infekcji i zapalenia kości, zagrażających utratą kończyny [312].

W przypadku podejrzenia neuroosteoartropatii Charcota **diagnostykę obrazową** należy rozpocząć od klasycznych zdjęć rentgenowskich [313]. W najwcześniejszym okresie artropatii neurogennej – w fazie 0 w modyfikacji klasyfikacji Eichenholza wg Shibaty [114] – kiedy klinicznie występuje typowa triada objawów pod postacią obrzęku, zaczerwienienia i wzrostu ucieplenia – na zdjęciach rentgenowskich najczęściej nie stwierdza się żadnych charakterystycznych zmian. Obserwuje się jedynie niespecyficzny obraz obrzęku tkanek miękkich i obecną często (według niektórych doniesień nawet w 70% przypadków) kalcyfikację naczyń [122].

Według niektórych autorów kliniczny obraz zapalenia może wyprzedzać pojawienie się zmian radiologicznych nawet o kilka miesięcy [314].

U niektórych pacjentów w fazie wczesnej można zaobserwować obecność dyskretnych złamań oraz dyslokacji kości. Jednym z pierwszych objawów radiologicznych może być nieznaczne przemieszczenie drugiej kości śródstopia względem pośredniej kości klinowatej, widoczne na zdjęciach w projekcji AP (przednio-tylnej), zwłaszcza jeśli możliwe jest porównanie obrazu ze zdjęciem drugiej stopy chorego. Nieco później obserwuje się redukcję kąta pochylenia kości piętowej oraz załamanie kąta skokowo-śródstopnego, jak również cechy destrukcji powierzchni stawowych z obecnością drobnych fragmentów kostnych. Badanie radiologiczne cechuje się jednak niską specyficznością. Bardziej nasilone zmiany mogą się pojawić w ciągu kilku kolejnych tygodni. Więcej informacji na temat struktur stopy u pacjentów z klinicznym podejrzeniem CN uzyskać można stosując obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego. Badanie to jest obecnie najlepszą metodą do różnicowania zmian w najwcześniejszej fazie neuroosteoartropatii. Za jej pomocą uwidocznisz obrzęk szpiku kostnego, który pojawia się zanim dojdzie do widocznych na zdjęciach rentgenowskich destrukcji kości oraz stawów (ryciny 8-11).

- We wczesnej fazie rozwoju zmian w badaniu radiologicznym stwierdza się złamania, obecność wolnych odłamków kostnych, podwichnięcia i dyslokacje. W obrazie rezonansu magnetycznego widoczny jest obrzęk szpiku kostnego, wysięki w stawach, zwichnięcia, fragmentacja i zniekształcenie układu kostnego stopy.
- W fazie późniejszej obserwuje się resorbcję fragmentów kostnych oraz tworzenie nowej kostniny.
- Faza końcowa, przewlekła, obejmuje proces rekonstrukcji oraz remodelingu i charakteryzuje się obecnością znacznych deformacji kostnych. Do najbardziej typowych należy deformacja typu bieguna kołyski. Stwierdza się również obecność zaawansowanych dyslokacji, ankylozy stawów oraz sklerotyzacji, którą uznać można za cechę charakterystyczną. Na każdym etapie rozwoju artropatii Charcota mogą się pojawić złamania przeciążeniowe, które zwykle w początkowym okresie nie są widoczne na zdjęciach radiologicznych. Dla ich uwidocznienia konieczne jest wykonanie badania metodą rezonansu magnetycznego. Pomimo swojej niskiej czułości i specyficzności, zwykle zdjęcia radiologiczne są podstawowym badaniem,

którego wykonanie jest zalecane w procesie wstępnej diagnostyki neuroosteartropatii Charcota.

Metody izotopowe (scyntygrafia) pozwalają na wczesne potwierdzenie wzmożonej przebudowy kostnej. Najczęściej wykorzystuje się trójfazową scyntyografię kości z użyciem technetu. Nieprawidłowości w tym badaniu mogą wyprzedzać zmiany stwierdzone w zwykłym zdjęciu radiologicznym. Niska specyficzność badań izotopowych ogranicza jednak szerokie zastosowanie tych metod w diagnostyce CN.

Podobnie brak typowych cech dla wczesnej fazy neuroosteartropatii Charcota, wykazują inne badania obrazowe w tym USG. Zastosowanie tomografii pozytonowej PET (*positron emission tomography*) w diagnostyce CN pozostaje jeszcze w fazie badań, a jego istotnym ograniczeniem jest wysoki koszt. Najczęściej diagnoza CN ustalana jest z dużym opóźnieniem a leczenie wdrażane późno.

Potwierdzenie hipotezy o występowaniu CN u osób ze zmianami genetycznymi dotyczącymi genów osi metabolicznej OPG/RANKL/RANK, stworzyłoby możliwość przewidywania wystąpienia tego powikłania u chorych z cukrzycą i wdrożenie postępowania profilaktycznego. Ponadto określanie poziomu RANKL w surowicy, który wg przytoczonych wyżej doniesień jest podwyższony u pacjentów z CN, stwarzałoby możliwość ustalenia wczesnej diagnozy.

1.2.11. Leczenie

Głównym celem współczesnego leczenia CN jest zahamowanie ostrego stanu zapalnego, zapobieganie urazom i deformacjom, zapobieganie powstawaniu owrzodzenia i infekcji.

Ze względu na nieznaną etiopatogenezę tego schorzenia (do tej pory istnieją tylko mniej lub bardziej prawdopodobne hipotezy), **nie ma leczenia przyczynowego**. Podstawowym ogólnie przyjętym postępowaniem, jest odciążenie chorej kończyny. Z powodu ograniczonej liczby randomizowanych badań dotyczących tego sposobu leczenia, nie ma pełnej zgodności, czy odciążanie powinno całkowicie eliminować wpływ sił nacisku na zajęłą kończynę (odciążenie całkowite), czy tylko je ograniczać (odciążenie częściowe). Obecnie złotym standardem w terapii ostrej neuroosteartropatii Charcota jest zastosowanie opatrunku gipsowego TCC (*total contact cast*) [315]. Pozwala on na zmniejszenie ob-

ciężenia, które zostaje bardziej równomierne rozłożone i częściowo przeniesione na podudzie [316]. Opatrunek taki różni się od klasycznego unieruchomienia, jakie stosuje się w przypadku złamań czy innych urazów kończyn u osób bez cukrzycy, przede wszystkim techniką zakładania – konieczne jest zastosowanie dużej ilości miękkich materiałów wewnątrz opatrunku i zabezpieczenie wszystkich wyniosłości kostnych oraz palców przed otarciami. Dodatkowo, opatrunek gipsowy musi być regularnie wymieniany z powodu zmniejszającego się obrzęku i ryzyka otarcia kończyny – początkowo co drugi dzień, a następnie co tydzień [317]. Czas trwania unieruchomienia kończyny niezbędny do zahamowania procesu zapalnego nie jest znany.

Nie dysponujemy żadnymi markerami laboratoryjnymi, za pomocą których można by monitorować aktywność procesu i zdecydować o zakończeniu leczenia. Jako pośredni wskaźnik stabilizacji służy pomiar różnicy temperatur pomiędzy stopą zdrową i zajęłą neuroosteartropatią – uważa się, że różnica poniżej 2°C pozwala na stopniowe obciążanie kończyny [318].

Metoda TCC, chociaż dość skuteczna i bezpieczna, w wielu wypadkach jest trudna do zaakceptowania przez chorego z uwagi na długi czas leczenia – średnio może wynosić on nawet 9 miesięcy [319].

Długotrwałe unieruchomienie kończyny jest obciążone skutkami ubocznymi takimi jak atrofia mięśni, przyrost masy ciała, dalsza utrata masy kostnej oraz przeciążenie kończyny kontralateralnej. U pacjentów z mniej nasilonymi deformacjami stosuje się ogólnie dostępne pogłębione buty ortopedyczne. Zadaniem takiego obuwia jest redystrybucja obciążenia oraz ochrona stopy [320].

Leczenie operacyjne pacjentów z neuroosteartropatią Charcota jest wyzwaniem dla chirurga z powodu związanej z cukrzycą skłonności do zakażeń, jak również współistniejącej osteopenii. Często stanowi jedyną szansę na zachowanie funkcji podporowej kończyny i poprawy warunków anatomicznych. Rozwój nowych technik operacyjnych oraz wiedzy na temat neuroosteartropatii Charcota powoduje, że postępowanie chirurgiczne jest coraz bardziej skuteczne [321].

Skutecznego **leczenia farmakologicznego** dla żadnej fazy neuroosteartropatii Charcota dotychczas nie opisano. Pierwsze próby farmakoterapii podjęto już kilkanaście lat temu z zastosowaniem bisfosfonianu drugiej generacji. Podstawą takiego leczenia był obserwowany wzmożony obrót kostny w neuroosteartropatii Charcota. Preparaty te wpływając hamująco na osteoklasty, mogłyby

przyczynić się do zahamowania ostrej fazy neuroosteoartropatii. Jude i wsp. [322] w randomizowanym badaniu obserwowali redukcję poziomu markerów obrotu kostnego w grupie pacjentów, otrzymujących pamidronat w infuzjach dożylnych w porównaniu z placebo.

Również Anderson w retrospektywnym badaniu 13 pacjentów otrzymujących pamidronat stwierdził obniżenie poziomu fosfatazy alkalicznej w porównaniu z grupą leczoną w sposób tradycyjny (tylko za pomocą odciążenia zajętej kończyny) [323]. Grupa Pitocco [324] podawała pacjentom z ostrą neuroosteoartropatią alendronat – w grupie otrzymującej lek obserwowano istotne obniżenie poziomu karboksy – końcowego telopeptydu kolagenu I typu.

Powyższe doniesienia sugerują, że bisfosfoniany mogą odgrywać rolę w leczeniu ostrej fazy neuroosteoartropatii. Jednak w opublikowanych ostatnio pracach Pakarinen i wsp. [146] oraz Game i wsp. [325] nie zaobserwowano korzystnego wpływu kwasu zoledronowego u 18 chorych z ostrą neuroosteoartropatią [146, 325].

Do grupy inhibitorów osteoklastów należy również kalcytonina. Podawanie donosowo w dawce 200 IU (łącznie z wapniem) w grupie ponad 30 chorych z neuroosteoartropatią spowodowało obniżenie poziomu karboksy – końcowego telopeptydu kolagenu I typu oraz fosfatazy alkalicznej w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą jedynie wapń [326]. Powyższe wyniki uzyskane na podstawie badań niewielkich grup pacjentów, nie mogą stanowić podstawy do zalecania bisfosfonianów lub kalcytoniny w leczeniu neuroosteoartropatii Charcota. Nowe odkrycia dotyczące patogenezy CN, roli procesu zapalnego ze szczególnym uwzględnieniem niektórych cytokin takich jak TNF- α , czy IL-6, oraz funkcji metabolicznej osi OPG/RANKL/RANK w remodelingu układu kostnego stwarzają szansę na rozwój leczenia przyczynowego (leczenie biologiczne).

W ciągu ostatnich 10 lat ukazało się kilkadziesiąt doniesień o skuteczności nowego leku w leczeniu osteoporozy. Denosumab jest ludzkim monoklonalnym przeciwciałem (IgG2) wiążącym się z RANKL, które cechuje się wysoką specyficznością i powinowactwem. Efekt działania jest podobny do OPG: zahamowanie działania RANKL i osteoklastogenezy [327, 328]. Liczne publikacje badań klinicznych na reprezentatywnym materiale chorych z osteoporozą wykazały dużą skuteczność i bezpieczeństwo leczenia biologicznego denosumabem (okres obserwacji 3-4 lata) [329, 330, 331, 332, 333].

Pozytywne wyniki leczenia chorych z osteoporozą denosumabem stanowiły podstawę do zarejestrowania leku w USA i w UE w 2010 r. Podawany jest on w

formie iniekcji podskórnej raz na 6 miesięcy. W toku leczenia denosumabem zaobserwowano u pacjentów zwiększoną częstość infekcji, zwłaszcza dróg moczowych. Prawdopodobnie związane jest to z brakiem wpływu RANKL na układ immunologiczny (aktywacja CD4 T-helper). Zahamowanie tej aktywności stwarza potencjalną możliwość uogólnionych infekcji u leczonych biologicznie pacjentów, jak również większej częstości powstawania nowotworów z powodu braku wystarczającego nadzoru immunologicznego [334].

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono do tej pory publikacji dotyczących skuteczności leczenia przeciwciałami anty RANKL pacjentów z CN.

2. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU

1. Neuroosteopropatia Charcota jest ciężkim powikłaniem cukrzycy rozwijającym się u chorych z neuropatią. Zbyt późno rozpoznana i nieleczona, prowadzi do całkowitej dezorganizacji struktury kostnej stopy i konieczności amputacji kończyny.

2. Rokowanie u pacjentów z tym powikłaniem jest złe. Oprócz nasilonej miejscowej osteopenii stwierdza się u nich znaczne zmiany w naczyniach krwionośnych pod postacią kalcyfikacji. Neuroosteopropatia cechuje się wysoką śmiertelnością, której przyczyna nie została dotychczas wyjaśniona.

3. Diagnostyka ostrej fazy neuroosteopropatii opiera się obecnie głównie na obrazie klinicznym. Badanie radiologiczne może nie wykazywać żadnych zmian, nie ma też parametrów laboratoryjnych pozwalających potwierdzić rozpoznanie. Sprawia to, że wiele przypadków pozostaje w tej wczesnej fazie nierozpoznanych, a w konsekwencji nieleczonych.

4. Etiopatogeneza tego powikłania nie jest znana, wiadomo jedynie, że powstaje ono na podłożu zaawansowanej neuropatii, przy współistnieniu zaburzeń metabolizmu kostnego a czynnikiem wyzwalającym jest prawdopodobnie uraz. Obecnie przeważa pogląd, że w grupie osób z neuroosteopropatią Charcota do postępującej utraty masy kostnej w zajętej stopie, przyczynia się nasilony proces zapalny. Wywołane urazem złamanie kości powoduje lokalne uwolnienie cytokin prozapalnych, między innymi zwiększoną ekspresję RANKL oraz syntezę NF- κ B, powodującego dojrzewanie osteoklastów a w następstwie – osteolizę. Z uwagi na obecność neuropatii i brak czucia bólu kończyna jest stale w sposób niekontrolowany obciążana. Dochodzi do kolejnych złamań, podtrzymywania procesu zapalnego, uwalniania cytokin oraz dalszej kontynuacji zapalenia – występuje mechanizm błędnego koła.

5. Nie wyjaśniona pozostaje przyczyna powodująca różnicę pomiędzy wysoką częstością występowania uszkodzenia obwodowego układu nerwowego w przebiegu cukrzycy a zdecydowanie rzadkim występowaniem neuroosteopropatii.

6. Nie wiadomo dlaczego neuroosteopropatii Charcota rozwija się tylko u niektórych pacjentów z neuropatią, natomiast u innych nie dochodzi do destrukcji układu kostnego. Oprócz samej neuropatii prawdopodobnie są jeszcze inne czynniki warunkujące rozwój tego powikłania u chorych z cukrzycą.

7. Ostatnio wielu badaczy łączy powstawanie CN ze zmianami genetycznymi w elementach mechanizmów regulujących gęstość tkanki kostnej, ponieważ u podstawy zmian w CN leży niewiadomego pochodzenia osteopenia. Osoby mające predyspozycje genetyczne byłyby narażone na występowanie tego powikłania. Od 2010 r. trwają dyskusja i badania na ten temat.

8. W ostatnich latach opisano współdziałający ze sobą układ trzech cytokin – OPG/RANKL/RANK, które – jak dowiedziono – odgrywają zasadniczą rolę w kontroli stanu układu kostno-szkieletowego. Wykazano istnienie zaburzeń funkcji tego układu w licznych chorobach tkanki kostnej, jak osteoporoza oraz osteopenia towarzyszące różnym schorzeniom.

Wyniki najnowszych badań wskazują, że system ten bierze również udział w powstawaniu zmian patologicznych w układzie naczyniowym (kalcyfikacja), a procesy biologiczne przebiegające w kościach i naczyniach mogą być ze sobą ściśle powiązane.

Powstaje pytanie, czy ten układ cytokin może być również zaangażowany w etiopatogenezę dwóch podstawowych, do tej pory niewyjaśnionych przyczynowo objawów, występujących z dużym nasileniem w CN: osteopenii i kalcyfikacji naczyń. Nieliczne doniesienia z ostatnich lat na ten temat wskazywałyby na taką możliwość.

U chorych z CN znajdowano podwyższony poziom RANKL i OPG w surowicy. Wiadomo, że RANKL ulega ekspresji w osteoblastach i wiąże się ze swoim receptorem umiejscowionym na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów, inicjując w ten sposób proces dojrzewania komórek kościogubnych, a następnie resorpcji tkanki kostnej. Wiązanie RANKL z RANK jest hamowane przez osteoprotegerynę stanowiącą „zastępczy” receptor dla RANKL – w ten sposób osteoprotegeryna zatrzymuje szlak dojrzewania osteoklastów, hamuje osteolizę i ma działanie ochronne w stosunku do tkanki kostnej, sprzyjając zachowaniu gęstości mineralnej kości.

Osteoprotegeryna wydaje się być zasadniczym regulatorem interakcji cytokin tego systemu. Najnowsze badania wykazały ekspresję tej cytokiny w komórkach mięśni gładkich oraz komórkach śródbłonna dużych i małych naczyń, gdzie może odgrywać rolę w procesach zapalenia i uszkodzenia endotelium. Tak więc osteoprotegeryna najprawdopodobniej jest ogniwem łączącym procesy zachodzące w tkance kostnej i naczyniach krwionośnych.

9. Potwierdzenie podwyższonych poziomów OPG i RANKL w surowicy chorych z CN i ewentualne ustalenie ich predykcyjnego znaczenia dla możliwo-

ści rozpoznania wczesnej fazy neuroosteoartropatii, może mieć duże znaczenie kliniczne. Publikowane do tej pory dane dotyczące poziomu osteoprotegeryny w surowicy krwi w różnych schorzeniach są sprzeczne. W osteoporozie obserwowano zarówno podwyższone jak i obniżone stężenia tej cytokiny, w reumatoidalnym zapaleniu stawów z kolei były one podwyższone. W odróżnieniu od szerokich badań nad osteoporozą, na temat poziomów OPG i RANKL w surowicy chorych z CN znaleziono dotychczas zaledwie kilka prac, w piśmiennictwie z lat 2009-2012, a dane w nich zamieszczone są niespójne.

W badaniach pilotażowych wykonywanych na potrzeby tej pracy (dane niepublikowane) stwierdzono, że poziom osteoprotegeryny u chorych neuroosteoartropatią Charcota i cukrzycą typu 1 jest podwyższony, natomiast u pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 pomimo występowania neuroosteoartropatii był zbliżony do wartości w grupie kontrolnej. Badania te na niewielkiej grupie chorych wymagają dalszego potwierdzenia.

Jest możliwe, że podwyższone poziomy OPG stanowią odzwierciedlenie mechanizmów kompensacyjnych mających na celu zahamowanie dojrzewania osteoklastów pobudzanych przez powstający w toku procesu zapalnego w dużych ilościach RANKL.

10. W niektórych niedawnych doniesieniach [67] stwierdzono szczególnie wysoki poziom RANKL u chorych z CN, u których obserwowano szczególnie nasiloną kalcyfikację naczyń. OPG została uznana za „wspólny klucz” wiążący patogenezę osteopenii i kalcyfikacji naczyń w CN [264]. Udowodnione zaangażowanie mediatorów homeostazy układu kostnego (OPG, RANKL) w kalcyfikację ścian naczyń, może stanowić nowy cel interwencji terapeutycznej.

11. Jak już wspomniano nadal pozostaje niewyjaśniony fakt powstawania CN tylko u niektórych chorych z neuropatią w przebiegu cukrzycy. Nie znaleziono mimo licznych badań, żadnej powtarzalnej zależności występowania tego powikłania od typu cukrzycy, jej wyrównania, płci, rasy oraz innych czynników. Istnieją naukowe podstawy pozwalające wiązać powstawanie neuroosteoartropatii Charcota z czynnikami genetycznymi.

Znajdują one uzasadnienie w wynikach pracy Langhda [296], która ze względu na decydującą rolę osteoprotegeryny w mechanizmie regulacji resorpcji kostnej oraz obrotu kostnego, przebadła gen OPG pod kątem występowania polimorfizmów. W grupie chorych z osteoporozą znaleziono 12 różnych wariantów tego genu. Od tego czasu ukazał się szereg prac dotyczących osteoporozy i obecności polimorfizmów genu OPG. Znajdowano najczęściej polimorfizmy

163A>G,245T>G i 1181C>G. Od roku 2002 wiadomo, że osteoporoza jest schorzeniem o podłożu genetycznym, a stan tkanki kostnej jest uzależniony od ekspresji wielu genów.

Dotychczas w literaturze światowej opublikowano tylko dwie prace w których badano związek neuroosteopatii Charcota z polimorfizmem genu osteoprotegeryny. W badaniu ośrodka włoskiego (grupa Pitocco) [294] uwzględniono dwa (1181G>C oraz 245T>G) z opisanych wcześniej polimorfizmów. Wyniki tej pracy wskazują na ścisłe powiązanie dwóch badanych wariantów genetycznych z występowaniem neuroosteopatii Charcota. Druga z prac pochodziła z naszego ośrodka [309] i uwzględniała pięć najczęściej występujących polimorfizmów genu osteoprotegeryny 6890A>C, 1217C>T, 1181G>C, 950T>C i 245T>G w CN. Wstępna analiza wykazała również związek ryzyka występowania neuroosteopatii Charcota z pewnymi wariantami genetycznymi genu osteoprotegeryny. Powyższe obserwacje wskazują na możliwy udział polimorfizmu genu osteoprotegeryny w rozwoju neuroartropatii Charcota i zachęcają do dalszych badań. W świetle dotychczasowych obserwacji wydaje się, że gen OPG może być genem kandydującym.

Ustalenie pewnych, powtarzalnych markerów genetycznych dla neuroosteopatii Charcota stworzyłoby możliwość, już na początku rozpoznania cukrzycy, wytypowania chorych, którzy rozwiną z dużym prawdopodobieństwem CN. Pozwoliłoby to wdrożyć postępowanie zapobiegawcze i uniknąć większości poważnych konsekwencji.

Podsumowując:

1. Neuroosteopatia Charcota do tej pory nie jest jednostką nozologiczną i ze względu na grupę objawów, które jej towarzyszą jest nazywana zespołem stopy Charcota, którego etiologia i patogeneza pozostają nieznane.

2. Odkrycia ostatnich lat i poznanie roli osi OPG/RANKL/RANK otworzyły drogę do badań nad wyjaśnieniem przyczyn powstawania dwóch podstawowych objawów w CN: osteopenii i kalcyfikacji naczyń. Wykazanie roli OPG i RANKL w etiopatogenezie CN stworzyłoby możliwości leczenia przyczynowego CN (leczenie biologiczne).

3. Nie wiadomo dlaczego CN rozwija się tylko u niektórych chorych. Istnieją przypuszczenia, że przyczyną jest predyspozycja genetyczna. Zmiany prawdopodobnie dotyczą genów cytokin OPG i RANKL. Ustalenie powtarzalnych powiązań występowania polimorfizmów genetycznych w genach *OPG* lub

RANKL w CN, stworzyłyby możliwość wdrożenia postępowania profilaktycznego na podstawie istniejących markerów genetycznych.

4. Nie wiadomo dlaczego CN występuje jednostronnie, podczas gdy zaburzenie metaboliczne są uogólnione. Podobne wątpliwości dotyczą miejscowego występowania osteopenii i kalcyfikacji naczyń, jak również braku generowania parametrów stanu zapalnego u tych chorych, mimo nasilonego zapalenia.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, postanowiono podjąć próbę oceny znaczenia osi OPG/*RANKL*/*RANK*, jak również odchyleń genetycznych w genach wymienionych cytokin – w etiopatogenezie neuroosteoartropatii Charcota.

3. CEL PRACY

Głównym celem podjętych badań była próba oceny w jakim stopniu w etiopatogenezie neuroosteopatii Charcota uczestniczy odkryty niedawno układ cytokin OPG/RANKL/RANK ze szczególnym uwzględnieniem roli polimorfizmu genów kodujących *OPG*, *RANKL* i *RANK* a także próba ustalenia, czy oznaczanie wariantów genetycznych genów kodujących te cytokiny może być pomocne w ocenie ryzyka wystąpienia neuroosteopatii (CN) u chorych na cukrzycę typu 1 i 2. Powyższy cel był realizowany poprzez przeprowadzenie badań u chorych: z cukrzycą nie powikłaną rozwojem neuropatii, z cukrzycą i neuropatią bez neuroosteopatii oraz chorych z neuropatią i neuroosteopatią Charcota. W materiale biologicznym pobranym od chorych z wymienionych wyżej grup określono:

1. Stężenie osteoprotegeryny w osoczu
2. Stężenie RANKL w osoczu
3. Częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genu kodującego osteoprotegerynę
4. Częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genu kodującego *RANKL*
5. Częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genu kodującego *RANK*

Analizowano korelację pomiędzy pięcioma badanymi polimorfizmami genu kodującego osteoprotegerynę oraz trzema polimorfizmami genu kodującego *RANKL* a:

- stężeniem osteoprotegeryny w osoczu
- stężeniem RANKL w osoczu

Ponadto w pracy przeprowadzona została ocena wpływu innych czynników, takich jak wiek, płeć, stopień wyrównania cukrzycy, czas trwania choroby oraz występowanie innych powikłań cukrzycy, na rozwój neuropatii oraz neuroosteopatii Charcota.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Pacjenci

Badaniom poddano 233 osoby (włączone do badań w okresie od stycznia 2009 r. do marca 2012 r.). Wśród badanych znajdowało się 139 dorosłych pacjentów rasy kaukaskiej z cukrzycą typu 1 i typu 2 oraz 94 osoby stanowiącą grupę kontrolną.

Pacjenci rekrutowani byli spośród chorych, będących pod opieką Regionalnego Centrum Diabetologii Kliniki Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badanie uzyskało pozytywną opinię Niezależnej Komisji Etyki Badań Klinicznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszyscy uczestnicy badania wyrazili pisemnie świadomą zgodę na udział w badaniu.

4.1.1. Zasady włączenia do badania

Do badania kwalifikowano chorych na podstawie następujących kryteriów:

- wiek od 18 do 82 lat,
- rozpoznana na podstawie obowiązujących kryteriów PTD [335] cukrzyca typu 1 lub 2, leczona lekami doustnymi lub insuliną.

Pacjenci nie byli włączani do badania jeżeli:

- nie byli zdolni lub chętni do wyrażenia świadomej zgody na udział w badaniu.
- stwierdzano u nich zaburzenia neurologiczne lub schorzenia układu kostnego inne niż związane z cukrzycą i jej powikłaniami, chorobę nowotworową, a także przewlekłe stany zapalne, schorzenia o podłożu immunologicznym lub byli leczeni sterydami.

4.1.2. Podział na grupy

Po uzyskaniu pisemnej zgody na udział w badaniu, uczestników kwalifikowano do następujących czterech grup badawczych:

1. Grupa CN – pacjenci z neuroosteopatią Charcota

2. Grupa N – pacjenci z neuropatią cukrzycową bez neuroosteopatii Charcota
3. Grupa D – chorzy z cukrzycą bez neuropatii i neuroosteopatii Charcota
4. Grupa C – (kontrolna) osoby nieobciążone cukrzycą ani schorzeniami układu kostnego, rekrutowane w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym i Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, niespokrewnione z pozostałymi uczestnikami badania

4.1.3. Zasady kwalifikacji pacjentów do grup

Pacjentów do grupy CN (osoby z neuroosteopatią Charcota) kwalifikowano na podstawie występowania cech neuropatii oraz typowego obrazu klinicznego pod postacią triady objawów: jednostronnego zaczerwienienia, obrzęku stopy oraz wzrostu jej ucieplenia (w porównaniu z kończyną kontralateralną), a także zmian w obrazie radiologicznym stopy. Wykluczone musiały zostać inne przyczyny mogące powodować podobne objawy, jak:

- stan zapalny kości (zwłaszcza w fazie przewlekłej, gdzie obraz radiologiczny może być bardzo podobny)
- zapalenie stawów (OB, CRP, leukocytoza)
- zapalenie tkanek miękkich i ropowica stopy (OB, CRP, leukocytoza)
- zapalenie żył głębokich (USG dopplerowskie)
- dna moczanowa (poziom kwasu moczowego, OB, CRP, leukocytoza)

Pacjentów do grupy N (osoby z neuropatią cukrzycową, ale bez neuroosteopatii Charcota), kwalifikowano w oparciu o stwierdzone cechy neuropatii czuciowo-ruchowej rozwijającej się na podłożu cukrzycy, po wykluczeniu innych przyczyn uszkodzenia obwodowego układu nerwowego, takich jak: niedobór witaminy B12, stosowanie neurotoksycznych leków np. cytostatyków, dziedziczne formy neuropatii, nadużywanie alkoholu, poważne schorzenia kręgosłupa, przebyte zatrucie metalami ciężkimi i in.

Do grupy D (chorzy z cukrzycą bez cech neuropatii) kwalifikowano osoby chore na cukrzycę, u których nie stwierdzano klinicznych objawów uszkodzenia obwodowego układu nerwowego.

Do grupy C (kontrolnej) kwalifikowane były osoby nieobciążone cukrzycą, bez aktualnej infekcji oraz schorzeń układu kostnego rekrutujące się spośród pacjentów Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego.

4.1.4. Podstawy diagnostyczne kwalifikacji do grup

Neuropatię cukrzycową rozpoznawano na podstawie badania klinicznego i oceny parametrów czucia oraz odruchów ścięgniastych [336, 337].

Próg czucia wibracji oceniano ilościowo, za pomocą neurotensjometru (Vibratron II; Physitemp Instruments, Inc. Clifton NJ, USA), jako średnią z trzech pomiarów. Końcówkę badającą urządzenia umieszczano na szczycie pierwszego palca obu stóp. Wartość powyżej 25 V uznawano za patologiczną [338].

W celu oceny czucia nacisku, w kilku wybranych punktach powierzchni podszwowej stopy umieszczano monofilament 10 g (Semmes-Weinstein monofilament-Touch-Test Sensory Evaluator; North Coast Medical, Morgan Hill, CA, USA) [336] natomiast do oceny czucia temperatury zastosowano urządzenie TipTherm (Bailey Instruments Ltd, Salford Quays, UK) umieszczane na grzbiecie stopy chorego [339].

U pacjentów oceniano również prawidłowość odruchów ścięgniastych ze ścięgna Achillesa [340].

Neuropatię rozpoznawano w przypadku symetrycznego zniesienia parametrów czucia i osłabienia lub zniesienia odruchów ścięgniastych po wykluczeniu innych niż cukrzyca przyczyn uszkodzenia obwodowego układu nerwowego [341].

Osoby, u których nie stwierdzano nieprawidłowości w badanych parametrach czucia, a odruchy ścięgniaste były prawidłowe, kwalifikowano jako pacjentów bez neuropatii.

Neuroosteoartropatię Charcota u chorych z cechami obwodowej polineuropatii czuciowo-ruchowej rozpoznawano na podstawie obrazu klinicznego: stwierdzanego w fazie ostrej jednostronnego obrzęku, zaczerwienienia stopy, lokalnego wzrostu jej ucieplenia (temperatura stopy zajętej procesem chorobowym wyższa od temperatury stopy kontralateralnej o ponad 2°C). Pomiaru temperatury dokonywano za pomocą termometru Thermo-Flash Infrared no contact thermometer LX-26 (Visiomed, France). Rozpoznanie potwierdzano badaniem obrazowym (zdjęcia RTG chorej kończyny). Wykonywano klasyczne ujęcia w

projekcji grzbietowo-podeszwowej oraz skośnej, w zależności od lokalizacji zmian, uzupełniane w razie potrzeby o zdjęcia stopy w projekcji bocznej oraz zdjęcia RTG stawu skokowego w projekcji przednio-tylnej i bocznej. W fazie przewlekłej na obrazach radiologicznych stwierdzano obecność destrukcji struktur kostno-stawowych – złamań, obecności fragmentów kostnych w rzucie tkanek miękkich, podwichnięć oraz zwichnięć w obrębie stawów stopy [116].

4.1.5. Charakterystyka i liczebność poszczególnych grup badanych pacjentów

Cała badana populacja liczyła 233 osoby: 139 chorych na cukrzycę, w tym 52 kobiety (37,4%) i 87 mężczyzn (62,6%) oraz 94 osoby nieobciążone cukrzycą ani schorzeniami układu kostnego tworzące grupę kontrolną. Średni wiek w całej badanej grupie chorych wynosił 58,5 ($\pm 11,0$) lat: kobiet – 58,6 ($\pm 11,2$) lat oraz mężczyzn – 58,4 ($\pm 11,0$) lat.

Analizowane grupy:

1. **Grupa chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN)** obejmowała 62 osoby: 19 kobiet (30,6% badanych) oraz 43 mężczyzn (69,4% badanych). Średni wiek w tej grupie wynosił 55,3 ($\pm 10,6$) lat (mediana 55,5 lat). 14 osób (22,6%) chorowało na cukrzycę typu 1. U pozostałych (77,4%) rozpoznano cukrzycę typu 2. Średni czas trwania cukrzycy w tej grupie pacjentów wynosił 14,6 ($\pm 8,4$) lat (mediana 13,5 lat). Średni czas trwania cukrzycy u pacjentów z typem 1 cukrzycy wynosił 21,07 ($\pm 9,8$) lat (mediana 21,0 lat) a w przypadku pacjentów z typem 2 cukrzycy 12,7 ($\pm 6,9$) lat (mediana 12,0)
2. **W grupie chorych z neuropatią cukrzycową bez neuroosteartropatii Charcota (N)** było 44 pacjentów: 14 kobiet (31,8%) i 30 mężczyzn (68,2%). Średni wiek pacjentów w tej grupie wynosił 62 lata ($\pm 7,7$ lat, mediana 62,0). U pięciu chorych (11,4%) rozpoznawano cukrzycę typu 1, u 39 (88,6%) osób cukrzycę typu 2. Średni czas trwania cukrzycy wynosił 17,1 lat ($\pm 8,2$ lat, mediana 17 lat). Średni czas trwania cukrzycy typu 1 w tej grupie chorych wynosił 29,6 lat ($\pm 7,8$ lat, mediana 30,0 lat), a cukrzycy typu 2 – 15,6 lat ($\pm 6,9$ lat, mediana 16,0 lat).

3. **Grupa pacjentów z cukrzycą bez neuropatii cukrzycowej i bez neuroosteopatii Charcota (D)** składała się z 33 osób: 19 kobiet (57,6%) i 14 mężczyzn (42,4%). Średni wiek pacjentów wynosił 59,9 lat ($\pm 13,9$ lat, mediana 63,0 lat). U 5 chorych (15,2%) rozpoznawano cukrzycę typu 1, a u 28 (84,8%) chorych cukrzycę typu 2. Średni czas trwania cukrzycy wynosił 10,8 lat ($\pm 4,2$ lat, mediana 11 lat). Średni czas trwania cukrzycy typu 1 w tej grupie wynosił 10,4 lat ($\pm 5,0$ lat, mediana 9,4 lat), a cukrzycy typu 2 – 10,9 lat ($\pm 4,1$ lat, mediana 11,0 lat).
4. **Grupa kontrolna (C)**, liczyła 94 osoby, w tym 42 kobiety (44,7%) i 52 mężczyzn (55,3%). Średni wiek w grupie kontrolnej wynosił 61,5 lat ($\pm 14,5$ lat, mediana 63 lat). Średni wiek kobiet – 61,6 lat ($\pm 17,2$ lat, mediana 64 lat), średni wiek mężczyzn 60,9 lat ($\pm 12,8$ lat, mediana 62 lat).

Strukturę liczebności, wieku, średniego czasu trwania cukrzycy, liczby chorych z cukrzycą typu 1 i typu 2 oraz sposobu leczenia w badanych grupach przedstawiają tabele 2, 3, 4.

Tabela 2. Liczba pacjentów w poszczególnych badanych grupach.
Table 2. Number of subjects in the studied groups.

Grupa Group	Liczba osób Number of subjects	Odsetek (%) Percent
CN	62	26,6%
N	44	18,9%
D	33	14,2%
C	94	40,3%
Razem / Total	233	100%

CN – Neuroosteopatia Charcota / Charcot neuroosteopathy, N – Neuropatia bez neuroosteopatii / Neuropathy without Charcot neuroosteopathy, D – Cukrzyca bez neuropatii / Diabetes, without neuropathy, C – grupa kontrolna / controls

Tabela 3. Średni wiek i czas trwania cukrzycy w badanych grupach.

Table 3. Mean age and diabetes duration in the studied groups.

Grupa pacjentów <i>Patients group</i>	Średni wiek (\pm SD) <i>Mean age (\pmSD)</i>	Średni czas trwania cukrzycy (\pm SD) <i>Mean diabetes duration (\pmSD)</i>
CN	55,3 (\pm 10,6)	14,6 (\pm 8,4)
N	62,0 (\pm 7,7)	17,1 (\pm 8,2)
D	59,9 (\pm 13,9)	10,8 (\pm 4,2)

Tabela 4. Liczba chorych z cukrzycą typu 1 i 2 w badanych grupach pacjentów.

Table 4. Number of patients with diabetes type 1 and type 2 in the study groups.

Grupa pacjentów <i>Patients group</i>	Chorzy z cukrzycą typu 1 <i>Patients with diabetes type 1</i>		Chorzy z cukrzycą typu 2 <i>Patients with diabetes type 2</i>	
	Liczba osób <i>Number of patients</i>	Odsetek <i>Percentage</i>	Liczba osób <i>Number of patients</i>	Odsetek <i>Percentage</i>
CN	14	22,6	48	77,4
N	5	11,4	39	88,6
D	5	15,2	28	84,8
Razem/Total	24	17,3	115	82,7

Łącznie w całej grupie badanych chorych było 111 (79,9%) osób leczonych insuliną, pozostali chorzy 28 osób (20,1%) otrzymywali leki doustne (tabela 5).

Tabela 5. Leczenie cukrzycy w badanych grupach chorych.

Table 5. Diabetes treatment in study groups.

Leczenie <i>Treatment modality</i>	Liczba (odsetek chorych) <i>Number (percentage of patients)</i>		
	CN	N	D
Insulina/ <i>Insulin</i>	60 (96,8%)	38 (86,4%)	13 (39,4%)
Doustne leki przeciwcukrzycowe <i>Oral antidiabetic drugs</i>	2 (3,2%)	6 (13,6%)	20 (60,6%)

4.2. Metody

4.2.1. Badanie lekarskie

U wszystkich objętych analizą osób wykonano badanie podmiotowe i przedmiotowe. Przeprowadzono wywiad dotyczący choroby podstawowej – w

szczegółności chorych pytano o występowanie cukrzycy w rodzinie, wiek i okoliczności zachorowania na cukrzycę, stosowane leczenie, przebyte amputacje oraz owrzodzenia. Pytano również o występowanie neuroosteoartropatii Charcota, osteoporozy i ewentualnych złamań kości w rodzinie chorego. Wywiad obejmował także pytania odnośnie występowania u pacjenta schorzeń tarczycy, nowotworów, chorób neurologicznych i układu kostnego innych niż związane z cukrzycą i jej powikłaniami. Zwracano uwagę na leki stosowane przez chorego obecnie i w przeszłości, zwłaszcza takie jak leki sterydowe, witaminy (szczególnie witamina D), bisfosfoniary, preparaty wapnia, leki hormonalne. W przypadku kobiet pytano o wiek, w którym rozpoczęła się u nich menopauza. Występowanie retinopatii wykluczano lub potwierdzano na podstawie badania przeprowadzonego przez okulistę

4.2.2. Badania laboratoryjne

U każdego pacjenta pobierano jednorazowo 15 ml krwi z żyły odłokciowej, do probówki zawierającej EDTA (K3EDTA *Antikoagulant Vacutest Kima*), do badań genetycznych oraz na skrzep w celu oznaczenia poziomu cytokin OPG i RANKL. Próbkę krwi w których oznaczane były poziomy cytokin wirowano przez 15 minut przy 2500×g w ciągu 30 minut od chwili pobrania i zamrażano w temperaturze -70°C. Próbkę przeznaczoną do analiz genetycznych (krew pełna) również przechowywano w temperaturze -70°C do czasu przeprowadzenia analiz. Krew pobierano na czczo. Jednocześnie pobierana była krew w celu przeprowadzenia rutynowo wykonywanych badań takich jak:

- poziom hemoglobiny glikowanej HbA1c metodą HPLC (zestaw firmy BIORAD-variant II) w celu oceny wyrównania cukrzycy,
- parametry stanu zapalnego takie jak CRP, OB, leukocytoza,
- poziom kreatyniny oraz GFR (*glomerular filtration rate*, współczynnik przesączania kłębuszkowego) – celem wykluczenia lub potwierdzenia niedomogi nerek,

W przypadku braku aktualnego wyniku (tj. wykonywanego w ciągu poprzedzających 12 miesięcy) u pacjentów, u których dotychczas nie rozpoznawano nefropatii, określano również wydalanie albumin z moczem za pomocą wskaźnika albumina/kreatynina wyliczanego na podstawie wyników ilościowych

oznaczeń w jednorazowo pobranej próbce moczu, zgodnie z zaleceniami PTD [335].

4.2.3. Oznaczanie stężenia OPG w surowicy

Stężenie OPG (osteoprotegeryny) w surowicy krwi oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA – *enzym-linked immunosorbent assay*) za pomocą gotowych zestawów firmy BioVendor (nr cat. RD194003200) do ilościowego oznaczania OPG według podanego protokołu. Limit detekcji 0,1 pmol/l. Zanim przystąpiono do pracy doprowadzono wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20-25°C) według zaleceń producenta. 50 µl próbki surowicy, po rozmrożeniu zostały trzykrotnie rozcieńczone w buforze do rozcieńczania (Dilution buffer). 100 µl rozcieńczenia zostało użyte do inkubacji z przeciwciałami według zaleceń producenta. Pomiaru absorbancji dokonano używając czytnika mikroplitek Wallac 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Absorbancja była mierzona przy długościach fal 450 nm i 630 nm, w ciągu pięciu minut po zatrzymaniu reakcji odpowiednim buforem. Wyniki pomiaru porównano z wzorcem stężeń osteoprotegeryny. Wzorzec ten został przygotowany według zaleceń producenta. W skrócie, przygotowano dwukrotne rozcieńczenia roztworu OPG (60 pmol/l) do najmniejszego stężenia 1,5 pmol/l, w buforze do rozcieńczania. Próbki OPG inkubowano z przeciwciałami jak wyżej, a następnie zmierzono absorbancję przy 450 nm i 630 nm. Wyniki absorbancji zostały przedstawione jako funkcja stężenia białka. Wzór opisujący linię trendu został wykorzystany do kalkulacji stężenia białka w badanych próbkach.

4.2.4. Oznaczanie stężenia RANKL w surowicy

Pomiar stężenia białka RANKL w surowicy wykonano za pomocą metody immunoenzymatycznej (ELISA – *enzym-linked immunosorbent assay*), do której wykorzystano zestaw ampli-sRANKL firmy Biomedica (nr cat. BI-20452) z limitem detekcji 0,02 pmol/l. Do analizy wykorzystano 100 µl surowicy i inkubowano z przeciwciałami według zaleceń producenta. Po zatrzymaniu reakcji absorbancje mierzono czytnikiem mikroplitek Wallac 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) przy długościach fal 490 nm i 630 nm. Wzorce stężeń RANKL

zostały przygotowane przez sporządzenie dwukrotnych rozcieńczeń wyjściowego roztworu (2 pmol/l) do uzyskania najmniejszego standardu 0,125 pmol/l. 100 µl rozcieńczenia RANKL zostały inkubowane z przeciwciałami jak wyżej. Wyniki absorbancji przedstawiono w funkcji stężenia. Wzór opisujący linię trendu został wykorzystany do obliczenia stężenia białka w badanych próbkach.

4.2.5. Badania genetyczne

4.2.5.1. Materiały i aparatura użyte do badań genetycznych

Materiały użyte do izolacji DNA z krwi (według protokołu QIAamp DNA Blood Mini Kit):

- proteinaza K
- bufor AL
- 96% etanol
- bufor AW1
- bufor AW2
- bufor AE

Materiały wykorzystywane do amplifikacji DNA metodą PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy):

- jałowa woda dejonizowana
- bufor reakcyjny 10x stężony (Roche)
- dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP – 10 mM każdy z roztworów nukleotydów (Roche)
- polimeraza Taq – 5 U/µl (Roche)
- matrycowe DNA
- startery – 20 µM (Thermo Fisher Scientific, Niemcy) (tabela 6)

Tabela 6. Sekwencje nukleotydowe starterów DNA stosowanych w reakcji amplifikacji genów: *OPG*, *RANK*, *RANKL*.

Table 6. DNA nucleotide sequence of primers used in amplification reactions of *OPG*, *RANKL*, *RANK* genes.

Nazwa startera	Sekwencja startera
SNP-F 245T>G	5' - CTGGAGACATATAACTTGAACA - 3'
SNP-R 245T>G	5' - CCATCATCAAAGGGCTATTGGT - 3'
SNP-F 950T>C	5' - GTTCCTCAGCCCCGGTGGCTTTT - 3'
SNP-R 950T>C	5' - TGTGGTCCCCGGAAACCTCAGG - 3'
SNP-F 1181G>C	5' - ACTTCCTGTTGCCGGGACGCT A - 3'
SNP-R 1181G>C	5' - TACCACGAGCGCGCAGCACCTCA - 3'
SNP-F 1217C>T	5' - GCAGGCGATACTTCCTGTT - 3'
SNP-R 1217C>T	5' - GTTCCTGCTCCAGCCTAAC - 3'
SNP-F 6890A>C	5' - GTATTGAATAGACTTCAGAAA - 3'
SNP-R 6890A>C	5' - AACTAAACATACATGCAGTCTT - 3'
SNP-F 421C>T	5' - GGCCACTGACCTGTCTCTTG - 3'
SNP-R 421C>T	5' - GACAGACGCACACATCCAAC - 3'
SNP-F 575C>T	5' - CCAAAGCACTGAACCACCTT - 3'
SNP-R 575C>T	5' - TGGCAGAGAAGAAGACTGCAAA - 3'
SNP-F 643C>T	5' - TGGTCAGCAACTTCCTTCTG - 3'
SNP-R 643C>T	5' - GACATTCCTCCTGCATCCAT - 3'
SNP-F 693G>C	5' - TGGTCAGCAACTTCCTTCTG - 3'
SNP-R 693G>C	5' - GACATTCCTCCTGCATCCAT - 3'
SNP-F 290C>T	5' - CCAAAGTAGAATGGATGCAGGAGG - 3'
SNP-R 290C>T	5' - TACTCCAGTGGTTCCAGACTCCCC - 3'
Nazwa startera	Starter do minisekwencjonowania
SNP - F 290C>T	5' - TTT TTT TTT T CAAA GGT GTC CTC TGC GTC TTC - 3'

Materiały użyte do trawienia enzymami restrykcyjnymi:

- Jałowa woda
- Enzymy restrykcyjne (Fermentas oraz New England BioLabs w przypadku Enzymu AciI) (tabela 7)

Tabela 7. Charakterystyka warunków trawienia oraz enzymów użytych w ocenie genotypów.
Table 7. Characteristics of digestion conditions and enzymes used in the genotypes assesment.

Nazwa enzymu (stężenie) <i>Name of the enzyme (concentration)</i>	Bufor reakcyjny <i>Reaction buffer</i>	Sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny <i>Sequence recognition by the restriction enzyme</i>	Temperatura trawienia <i>Digestion temperature (°C)</i>
HinfI (10 units/μl)	Bufor R	5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G- 5'	37
HincII (HindII) (10 units/μl)	Bufor Tango	5'-G T Py [^] Pu A C-3' 3'-C A Pu [^] Py T G-5'	37
SmoI (SmlI) (10 units/μl)	Bufor Tango	5'-C [^] T Py Pu A G-3' 3'-G A Pu Py T [^] C- 5'	55
BsuRI (HaeIII) (10 units/μl)	Bufor R	5'-G G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'	37
BclI (10 units/μl)	Bufor G	5'-T [^] G A T C A-3' 3'-A C T A G [^] T-5'	55
BseDI (BsalI) (10 units/μl)	Bufor Tango	5'-C [^] C N N G G-3' 3'-G G N N C [^] C-5'	55
AciI (10 units/μl)	1X NEBuffer 3	5'-C [^] C G C-3' 3'-G G C [^] G-5'	37
Enzymy Fast Digest / Enzymes Fast Digest			
Csp6I (FD)	Bufor FD	5'-G [^] T A C-3' 3'-C A T [^] G-5'	37
TspRI (TscaAI) (FD)	Bufor FD	5'-N N C A S T G N N [^] -3' 3'- [^] N N G T S A C N N-5'	65

Materiały użyte do przygotowania żelu agarozowego

- bufor TBE (89 mM Tris, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA) pH=7,2
- TBE 5×stężony (Na 1000 ml: 54g Tris (pH=8,2-8,3); 20 ml 0,5M EDTA; 27,5 g kwasu borowego)
- TBE 0,5×stężony (Na 1000 ml: 100 ml TBE 5×stężony; 900 ml wody dejonizowanej (Millipore))
- Agaroz (Promega)
- wodny roztwór bromku etydyny (EtBr) o stężeniu 10 mg/ml

- bufor obciążający (30% glicerol; 0,25% błękit bromofenolowy; 1 mM EDTA)
- wzorzec masowy: *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder* (Fermentas)
- barwnik obciążający do elektroforezy – *6×DNA Loading Dye* [Fermentas]

Odczynniki i akcesoria do analizy fragmentów i sekwencjonowania DNA

- polimer stosowany do rozdziału elektroforetycznego – POP-4™
- 10×stężony bufor elektroforetyczny – Runing Buffer 10× (Applied Biosystems)
- wysoko dejonizowany formamid Hi-Di™ (Applied Biosystems)
- wzorzec wielkości Gene Scan LIZ – 120™ Size Standard [Applied Biosystems]
- kapilary do sekwenatora – 310 Genetic Analyzer Capillary o długości 47 cm (sekwencjonowanie) [Applied Biosystems]
- zestaw standardów do przygotowania matrycy do analizy sekwencji *Matrix Standard Set DS-02 (dR110, dRGG, dTAMRA, dROX, LIZ)*
- zestaw do przeprowadzenia reakcji sekwencyjnej (ABI Prism SNaP-shot™ Multiplex System Applied Biosystem)
- woda o wysokiej jakości (Merck)
- zestaw do usuwania terminatorów po reakcji sekwencyjnej (Exo Sap)

Aparatura

- wirówka: Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- wytrząsarka: Reax top (Heidolph)
- termomikser: Thermomixer komfort (Eppendorf)
- termocykler: Mastercycler 384 (Eppendorf)
- aparat do elektroforezy: Mupid-exU Submarine electrophoresis system
- UV CCD kamera wraz z oprogramowaniem (BIO-RAD)
- kuchenka mikrofalowa
- analizator kwasów nukleinowych *ABI Prism 310* (Applied Biosystems)
- czytnik mikroplątek *Wallac 1420 Multilabel Counter* (Perkin Elmer)

4.2.5.2. Oznaczanie polimorfizmów genów kodujących *OPG*, *RANKL* i *RANK*

W oparciu o dostępne publikacje dotyczące występowania polimorfizmu genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* wytypowano 5 spośród 12 opisanych polimorfizmów genu osteoprotegeryny (245T>G, 950T>C, 1181G>C, 1217C>T oraz 6890A>C), trzy polimorfizmy genu *RANK* (290C>T, 643C>T, 693G>C) i dwa polimorfizmy genu *RANKL* (421C>T, 575C>T).

W celu zanalizowania polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* stosowano metodę RLFP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), na którą składają się:

1. Izolacja DNA z krwi
2. Reakcja amplifikacji DNA metodą PCR
3. Elektroforeza w żelu agarozowym
4. Trawienie enzymami restrykcyjnymi ampliconów PCR
5. Rozdział w sekwenatorze kapilarnym

Ad 1. Izolacja DNA z krwi (według protokołu QIAamp DNA Blood Mini Kit):

Procedura została wykonana według instrukcji producenta (Qiagen). Do próbek typu Eppendorf odmierzone po 20 µl enzymu – proteinazy K, do którego dodawano 200 µl krwi pobranej na EDTA oraz 200 µl buforu do lizy AL. Całość wymieszano na wortexie firmy Heidolph przez 15 sekund, a następnie inkubowano w temperaturze 56°C przez 10 minut. Po krótkim wirowaniu, do próbek dodawano 200 µl 96% etanolu i ponownie wortexowano 15 sekund. W celu usunięcia kropeł z wieczka, mieszaninę szybko wirowano, a następnie przenoszono do kolumniek ze złożem krzemionkowym, załączonych w zestawie. Próby wirowano przez 1 minutę przy 6000×g. Kolumnę przenoszono do nowej probówki, a przesącz odrzucano. Kolumnę przemyto dwukrotnie 500 µl buforu AW1, a następnie 500 µl buforu AW2. Każde wirowanie pomiędzy płukaniem trwało 1 min przy 6000×g poza ostatnim które trwało 3 min przy 20000×g. Na kolumnę nakładano następnie 200 µl buforu do elucji AE i po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wszystkie próby wirowano 1 minutę przy 6000×g. Po tym wirowaniu uzyskiwano już oczyszczone DNA, gotowe do użycia w dalszej analizie genetycznej. Odwirowaną mieszaninę za-

wierającą wyizolowane DNA z krwi pacjentów przechowywano w zamrażarce (-20°C).

Ad 2. Reakcja amplifikacji DNA metodą PCR

Reakcję amplifikacji DNA przeprowadzano na matrycy DNA genomowego przy wykorzystaniu odpowiednio dobranej pary starterów (tabela 8) oraz profilu temperaturowo-czasowego (tabela 9). Reakcję PCR wykonano w termocyklerze, a następnie obserwowano wyniki pod lampą UV po rozdiale elektroforetycznym w żelu agarozowym.

Tabela 8. Protokół przygotowania mieszaniny reakcyjnej.

Table 8. Protocol for preparation of reaction mixture.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość
Jałowa woda / <i>Sterile water</i>	9,83 μ l
Bufor / <i>Buffer</i>	1,5 μ l
dNTPs	0,3 μ l
Starter F / <i>F starter</i>	0,15 μ l
Starter R / <i>R starter</i>	0,15 μ l
Polimeraza / <i>Polymerase</i>	0,075 μ l
DNA matrycowe / <i>DNA template</i>	3 μ l

Tabela 9. Profil temperaturowy dla reakcji amplifikacji DNA.

Table 9. Temperature profile for amplification reaction.

Profil temperaturowy (°C) <i>Temperature profile</i>	Czas / Time (min.s)
95	5.00
95	0.45
T	0.45
72	0.45
72	7.00
4	∞

} 35 cykli
35 cycles

Poniżej przedstawiono odpowiednie temperatury przyłączania dla kolejnych par starterów. Optymalne temperatury zostały wyznaczone eksperymentalnie za pomocą gradientu temperaturowego.

SNP-F 245T>G oraz SNP-R 245T>G	– T: 53°C
SNP-F 950T>C oraz SNP-R 950T>C	– T: 65°C
SNP-F 1181G>C oraz SNP-R1181G>C	– T: 60°C
SNP-F 1217C>T oraz SNP-R 1217C>T	– T: 59°C
SNP-F 6890A>C oraz SNP-R6890A>C	– T: 51°C
SNP-F 421C>T oraz SNP-R 421C>T	– T: 59°C
SNP-F 575C>T oraz SNP-R 575C>T	– T: 58°C
SNP-F 643C>T oraz SNP-R 643C>T	– T: 60°C
SNP-F 693G>C oraz SNP-R 693G>C	– T: 60°C

Ad 3. Elektroforeza w żelu agarozowym

Aparat do elektroforezy przygotowywano wlewając do niego 0,5× stężony roztwór TBE. 1% żel agarozowy przygotowano w 0,5× stężonym roztworze TBE. Rozgrzany żel agarozowy ostudzono do temperatury około 45-50°C, a następnie dodawano bromku etydyny (EtBr) do końcowego stężenia 100 ng/ml. Żel wylewano do uprzednio zmontowanej formy. Po zastygnięciu żelu i umieszczeniu go w aparacie, na studzienki nanoszono po 8 µl produktów powstałych po amplifikacji metodą PCR oraz 2 µl wzorca masowego. Rozdział prób w żelu przeprowadzono przy stałym napięciu 7 V/cm, przez 40 minut. Na koniec żel analizowano pod lampą UV.

Ad 4. Trawienie enzymami restrykcyjnymi ampliconów PCR utworzonych na matrycy genomowego DNA

- **Analiza polimorfizmów:** 245T>G (enzym restrykcyjny HinfI), 950T>C (HincII), 1217C>T (BsuRI), 575C>T (AciI). Trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano przez zmieszanie 10µl produktu PCR, buforu reakcyjnego adekwatnego dla danego enzymu restrykcyjnego według zaleceń producenta oraz 1 µl enzymu (HinfI (10U), HincII (10U), BsuRI (10U)) w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Następnie zatrzymywano reakcję trawienia poprzez termiczną inaktywację przez

20 minut w temperaturze 80°C. Jednocześnie w tych samych warunkach przeprowadzano reakcję trawienia genomowego DNA w obecności enzymu AciI (10 U) bez inaktywacji termicznej enzymu.

- **Analiza polimorfizmów:** 6890A>C (enzym restrykcyjny BclI), 1181G>C (SmoI), 693G>C (BseDI). Trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę reakcyjną przygotowano przez zmieszanie 10µl produktu PCR, buforu reakcyjnego adekwatnego dla danego enzymu restrykcyjnego według zaleceń producenta oraz 1 µl enzymu (SmoI (10U), BcII (10U), BseDI (10U)) w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 55°C przez 4 godziny. Następnie zatrzymywano reakcję trawienia poprzez termiczną inaktywację przez 20 minut w temperaturze 80°C. Jednocześnie w tych samych warunkach przeprowadzano reakcję trawienia genomowego DNA w obecności enzymu BseDI (10 U) bez inaktywacji termicznej enzymu.
- **Analiza polimorfizmów:** 421C>T (enzym restrykcyjny Csp6I), 643C>T (TspRI). Trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę reakcyjną przygotowano przez zmieszanie 10 µl produktu PCR, buforu reakcyjnego adekwatnego dla danego enzymu restrykcyjnego według zaleceń producenta oraz 1 µl enzymu (Csp6I (10U),TspRI (10U)) w całkowitej objętości 30 µl. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut w przypadku enzymu TspRI, natomiast w przypadku enzymu Csp6I mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 5 minut, następnie zatrzymywano reakcję poprzez termiczną inaktywację w temperaturze 80°C przez 10 minut.
- **Analiza otrzymanych fragmentów** po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Aparaturę oraz żel agarozowy,przygotowano według procedury opisanej w rozdziale 2.3. Wyniki reakcji trawienia obserwowano po rozdiale elektroforetycznym w 2,5% żelu agarozowym. Na koniec detekcję prowadzono przy świetle UV.
- **Analiza polimorfizmu 290C>T** za pomocą minisekwencjonowania
 - A. Amplifikacja intronu genu *RANKL* za pomocą metody PCR
Do amplifikacji wykorzystano primery SNP-F 290C>T i SNP-R 290C>T. Reakcję PCR przeprowadzono w całkowitej objętości 15 µl. Mieszanina składała się z 1,5 µl buforu (10×), 0,3 µl mieszaniny

dNTP (2 mM), 0,15 μ l startera SNP-F 290C>T (20 μ M) oraz 0,15 μ l SNP-R 290C>T (20 μ M) oraz 0,075 μ l polimerazy Taq (2,5 U/ μ l), 40 ng matrycy DNA, następnie wszystko dopełniono jałową wodą redestylowaną do objętości 15 μ l. Reakcja amplifikacji DNA odbywała się w termocyklerze według następującego programu (tabela 10):

Tabela 10. Program amplifikacji.

Table 10. Amplification programme.

Profil temperaturowy (°C) <i>Temperature profiles</i>	Czas / Time (min.s)
95	5.00
95	0.45
59	0.45
72	0.45
72	7.00
4	∞

} 35 cykli
35 cycles

B. Oczyszczanie produktów PCR z wolnych nukleotydów oraz oligonukleotydów

Aby móc wykorzystać produkty reakcji PCR jako matrycę do reakcji minisekwencjonowania każdorazowo z roztworu usuwano wolne nukleotydy oraz startery za pomocą mieszaniny Egzonukleazy I oraz alkalicznej fosfatazy. Mieszaninę ExoSap dodawano do produktu PCR (15 μ l) w ilościach:

5 U SAP oraz 2 U ExoI. Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 minut, a następnie inaktywowano w temperaturze 75°C przez 15 minut.

C. Minisekwencjonowanie DNA

Zestaw standardów do przygotowania matrycy do analizy sekwencji przygotowano według zaleceń producenta Matrix Standard Set DS-02 [dR110, dRGG, dTAMRA, dROX, LIZ][4323050]. Następnie reakcję sekwencjonowania prowadzono w całkowitej objętości 10 μ l z użyciem zestawu ABI PRISM® SnaPshot® Multiplex Kit [nr.cat.4323151 Applied Biosystems] z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych dideoksyrybonukleotydów (ddNTP). Miesza-

nina składała się z 5 μ l SnaPshot Multiplex ready Reaction Mix, 3 μ l produktu PCR, 20 pM primera SNP – F 290C>T do minisekwencjonowania (32 nukleotydy) oraz 1 μ l wody redestylowanej. Reakcja minisekwencjonowania odbywała się w termocyklerze według następującego programu (tabela 11):

Tabela 11. Program minisekwencjonowania.

Table 11. Minisequencing programme.

Profil temperaturowy (°C) <i>Temperature profile</i>	Czas / Time (min.s)
96	0.10
50	0.05
60	0.35
4	∞

} 35 cykli
35 cycles

Następnie po reakcji sekwencyjnej usuwano nieprzyłączone dideoksyrybonukleotydy przy użyciu alkalicznej fosfatazy. Do otrzymanych produktów dodano 1U SAP, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 minut, na koniec przeprowadzono inaktywację w temperaturze 75°C przez 15 minut.

Ad 5. Rozdział w sekwenatorze kapilarnym

W celu przygotowania próbek do rozdziału mieszano 9 μ l formamidu Hi-Di™, 0,5 μ l Gene Scan™120 LIZ™ Size Standard oraz 0,5 μ l oczyszczonego produktu DNA. Całą mieszaninę denaturowano (temperatura 95°C przez 5 minut), a następnie rozdzielano za pomocą polimeru POP-4 w kapilarze analizatora ABI Prism 310 (Applied Biosystems) w warunkach denaturujących w temperaturze 60°C w czasie 20 minut. Chromatogramy analizowano przy pomocy programu Gene Scan™ v.3.1.2 i określano długość uzyskanych produktów.

4.2.6. Metody analizy statystycznej

Analizy zostały wykonane przy użyciu oprogramowania STATISTICA 10 StatSoft Inc. Do oceny istotnych różnic pomiędzy danymi ilościowymi stosowany był test t-Studenta (dla porównania średnich dwóch prób), jednoczynnikowa analiza wariancji (dla porównania średnich więcej niż dwóch prób) z testem

post-hoc Tukeya dla nierównych liczebności prób, test Kruskala-Wallis (dla zmiennych, których rozkłady nie były zgodne z rozkładem normalnym). Test chi kwadrat został użyty do oceny różnic pomiędzy rozkładami polimorfizmów oraz do oceny zachowania równowagi Hardy-Weinberga. Analiza regresji logistycznej została zastosowana w celu zbadania związku parametrów biochemicznych i polimorfizmów z rozwojem neuroosteoartropatii Charcota u osób z cukrzycą. Analiza genotypowa została wykonana przy użyciu pakietu R (wersja 2.10.1; Bell Laboratories, Murray Hill, NJ, USA). Do analiz sprzężeń (*pairwise linkage disequilibrium between genetic markers*) użyto testu chi kwadrat.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka badanych osób

Analizie poddano 139 chorych na cukrzycę w tym 52 kobiety (37,4%) i 87 mężczyzn (62,6%), a także 94 osoby z grupy kontrolnej – 42 kobiety (44,7%) i 52 mężczyzn (55,3%). W grupie pacjentów z neuroosteopatią Charcota (CN) były 62 osoby (44,6%), grupa chorych z neuropatią bez neuroosteopatii (N) liczyła 44 pacjentów (31,7%), a w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii i bez neuroosteopatii (D) były 33 osoby (23,7%).

Średni wiek w całej badanej grupie chorych wynosił 58,5 ($\pm 11,0$) lat – w tym dla kobiet 58,6 ($\pm 11,2$) lat oraz dla mężczyzn 58,4 ($\pm 11,0$) lat. Średni wiek w grupie kontrolnej wynosił 61,5 ($\pm 14,5$) lat, w tym dla kobiet 61,6 ($\pm 17,2$) lat, a dla mężczyzn 60,9 ($\pm 12,8$) lat.

Rozkład wieku dla grup chorych N oraz CN nie różnił się istotnie od rozkładu normalnego (wartość testu Shapiro-Wilka wynosił odpowiednio dla grupy N i CN 0,96 i 0,98 oraz $p=0,12$ i $p=0,32$); rozkład wieku dla grupy chorych D różnił się istotnie od rozkładu normalnego (wartość testu Shapiro-Wilka wynosiła 0,92, $p=0,016$). Średni wiek w grupie kontrolnej nie różnił się istotnie od grupy chorych.

Średni wiek w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) wynosił 59,9 ($\pm 13,9$) lat, w grupie chorych z cukrzycą i neuropatią bez neuroosteopatii Charcota (N) 62,0 ($\pm 7,7$) lata, a w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) 55,3 ($\pm 10,6$) lat (tabela 12).

Tabela 12. Wiek pacjentów w poszczególnych grupach.
Table 12. Age of patients in study groups.

Grupa Study	Liczba badanych Number of subjects	Średni wiek \pm SD (lata) Mean age \pm SD (years)	Min. (lat/years)	Max (lata/years)	Mediana (lata) Median (years)
D	33	59,9 \pm 13,9	21	78	63,0
N	44	62,0 \pm 7,7	37	75	62,0
CN	62	55,3 \pm 10,6	23	78	55,5
C	94	61,5 \pm 14,5	26	82	63,0
Razem/Total	233				

D – cukrzyca bez neuropatii/diabetes without neuropathy, N – neuropatia bez neuroosteopatii/Neuropathy without Charcot neuroosteoarthropathy, CN – Neuroosteopatia Charcota/Charcot neuroosteoarthropathy, C – grupa kontrolna/Controls

Wiek pacjentów w badanej populacji chorych z CN ($55,3 \pm 10,6$ lat) różnił się zmiennie od wieku chorych w pozostałych dwóch grupach, byli oni młodsi od osób w grupie N i D – wiek odpowiednio $62 \pm 7,7$ lat i $59,9 \pm 13,9$ lat (CN vs D $p=0,017$, CN vs N $p=0,002$).

Dane dla wieku kobiet i mężczyzn w poszczególnych grupach chorych przedstawiają tabele 13-15.

Tabela 13. Wiek mężczyzn w poszczególnych grupach chorych.

Table 13. Age of patients – males, in study groups.

Grupa Group	Liczebność Number of subjects	Średni wiek±SD (lata) Mean age±SD (years)	Min. (lata/years)	Max (lat/years)	Mediana (lata) Median (years)
D	14	$62,1 \pm 12,2$	28	78	65,5
N	30	$61,9 \pm 8,6$	37	75	61,5
CN	43	$54,7 \pm 11,1$	23	78	55,0
Razem Total	87	$58,4 \pm 11,0$	23	78	58,0

Tabela 14. Wiek kobiet w poszczególnych grupach chorych.

Table 14. Age of patients – females, in study groups.

Grupa Group	Liczebność Number of subjects	Średni wiek±SD (lata) Mean age±SD (years)	Min. (lata/years)	Max (lata/years)	Mediana (lata) Median (years)
D	19	$58,2 \pm 15,1$	21	78	59
N	14	$62,0 \pm 5,6$	50	72	62
CN	19	$56,6 \pm 9,7$	37	78	57
Razem Total	52	$58,6 \pm 11,2$	21	78	59

Tabela 15. Wiek kobiet i mężczyzn w grupie kontrolnej.

Table 15. Age of patients – females and males in control group.

Płeć Sex	Liczebność Number of subjects	Średni wiek±SD (lata) Mean age±SD (years)	Min. (lata/years)	Max (lata/years)	Mediana (lata) Median (years)
Mężczyźni Males	52	$60,9 \pm 12,8$	28	82	62
Kobiety Females	42	$61,6 \pm 17,2$	28	81	64

Średni czas trwania cukrzycy w badanych grupach różnił się istotnie pomiędzy grupą chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii Charcota (N) a pacjentami z cukrzycą bez neuropatii (D), wynosił odpowiednio 17,1 ($\pm 8,2$) lat oraz 10,8 ($\pm 4,2$) lat ($p < 0,05$). W grupie chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) średni czas trwania cukrzycy wynosił 14,6 ($\pm 8,4$) lat (tabela 16).

Tabela 16. Czas trwania cukrzycy w poszczególnych grupach chorych.
Table 16. Diabetes duration in study groups.

Grupa Group	Średni czas trwania cukrzycy \pm SD (lata) Mean diabetes dura- tion \pm SD (years)	Min. (lata/years)	Max (lata/years)	Mediana (lata) Median (years)
D	10,8 \pm 4,2	4	22	11
N	17,1 \pm 8,2	3	37	17
CN	14,6 \pm 8,4	3	42	13,5

Wskaźnik masy ciała (BMI) w poszczególnych grupach chorych był podobny i wynosił średnio: w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) 29,4 ($\pm 4,5$) kg/m², w grupie pacjentów z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) (30,2) \pm 5,5 kg/m², a w grupie chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) 30,6 \pm 5,0 kg/m². Nie stwierdzano istotnych statystycznie różnic w wartości BMI pomiędzy badanymi grupami ($p = 0,52$) (tabela 17).

Tabela 17. BMI w poszczególnych grupach.
Table 17. BMI in study groups.

Grupa Group	Średni wskaźnik masy ciała \pm SD Mean BMI \pm SD (kg/m ²)	Min. (kg/m ²)	Max (kg/m ²)	Mediana Median (kg/m ²)
D	29,4 \pm 4,5	22,8	39,4	29,1
N	30,2 \pm 5,5	20,2	48,8	28,9
CN	30,6 \pm 5,0	20,7	42,4	29,5

5.2. Inne powikłania cukrzycy w badanych grupach chorych

W grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) u 6 osób (18,2%) stwierdzano **retinopatię** a u 1 osoby **nefropatię**. W grupie chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii Charcota (N) u 24 pacjentów (54,5%) rozpoznawano retinopatię a u 6 (13,6%) nefropatię. W grupie chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) retinopatia występowała u 51 (82,3%) a nefropatia u 29 (46,8%) chorych (tabela 18).

Tabela 18. Występowanie retinopatii i nefropatii w grupach chorych.
Table 18. Prevalence of retinopathy and nephropathy in study groups.

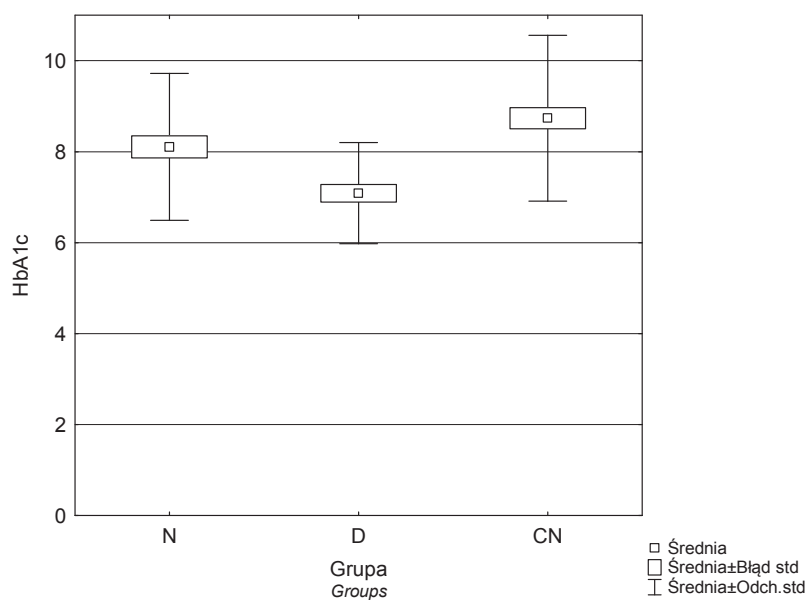
Grupa Group	Liczba chorych Number of subjects	Retinopatia (odsetek) Retinopathy (Percentage)	Nefropatia (odsetek) Nephropathy (Percentage)
D	33	6 (18,1%)	1 (3,0%)
N	44	24 (54,5%)	6 (13,6%)
CN	62	51 (82,3%)	29 (46,8%)

Wyniki badań laboratoryjnych w poszczególnych grupach chorych

Analizując wyniki badań dodatkowych w badanych grupach chorych: z cukrzycą bez neuropatii (D), chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii Charcota (N) oraz chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) wykazano że średni **poziom HbA1c** w grupie osób chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) jest niższy od poziomu HbA1c u osób chorych na cukrzycę, u których stwierdzono neuropatię bez neuroosteartropatii (N) (odpowiednio $7,1 \pm 1,1\%$ i $8,1 \pm 1,6\%$; $p=0,014$). Obserwowano również istotną różnicę średniego poziomu HbA1c pomiędzy grupą chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) w której stężenie HbA1c wynosiło $8,7 \pm 1,8\%$, a grupą osób chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) ($p=0,0001$). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) a chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii Charcota (N) (tabela 19, rycina 14).

Tabela 19. Poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w grupach chorych.
 Table 19. Glycated hemoglobin (HbA1c) levels in study groups.

Grupa Group	Średni poziom HbA1c±SD Mean HbA1c level±SD (%)	Min. (%)	Max (%)	Mediana Median (%)
D	7,1 ±1,1	5,4	9,6	6,6
N	8,1 ±1,6	5,5	11,6	7,82
CN	8,7 ±1,8	5,1	13,4	8,35



N – neuropatia bez neuroosteoartropatii/neuropathy without Charcot neuroosteoarthropathy, D – cukrzyca bez neuropatii/diabetes without neuropathy, CN – neuroosteoartropatia Charcota/Charcot neuroosteoarthropathy; HbA1c-%

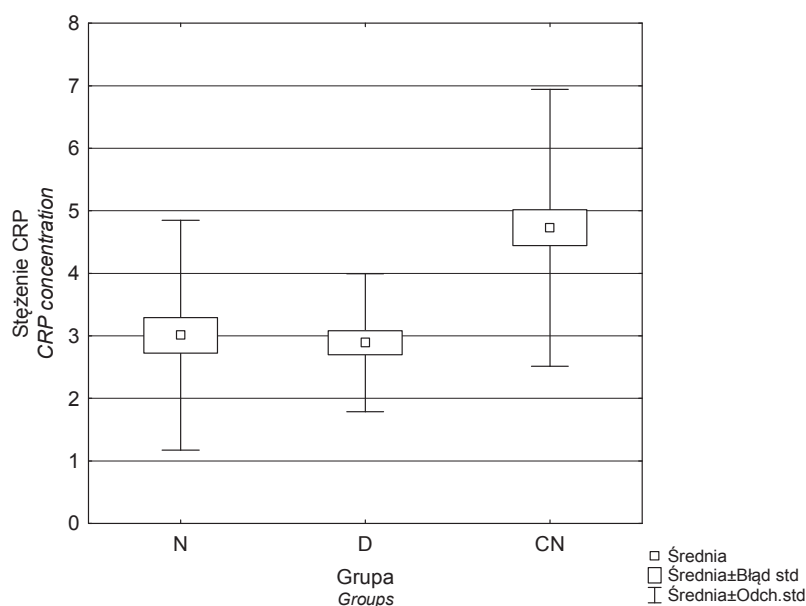
Ryc. 14. Średni poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w badanych grupach.
 Fig. 14. Mean glycated hemoglobin (HbA1c) levels in study groups.

Średni poziom **białka ostrej fazy (CRP)** różnił się istotnie pomiędzy grupą chorych z neuroosteoartropatią Charcota (CN) a pozostałymi badanymi grupami i wynosił w tej grupie 4,7 (±2,2) mg/l, w grupie chorych z neuropatią bez neuroosteoartropatii Charcota (N) 3,0 (±1,8) mg/l, a w grupie osób chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) 2,9 (±1,1) mg/l (grupa CN vs N – p=0,0002, CN vs D

– $p=0,0003$). Między grupami N i D nie było istotnych różnic w średnim poziomie CRP (tabela 20, rycina 15).

Tabela 20. Poziom białka ostrej fazy (CRP) w badanych grupach chorych.
Table 20. C-reactive protein (CRP) levels in study groups.

Grupa Group	Poziom białka ostrej fazy \pm SD C-reactive protein levels in the study groups \pm SD (mg/l)	Min. (mg/l)	Max (mg/l)	Mediana Median (mg/l)
D	2,9 \pm 1,1	0,8	4,6	3,2
N	3,0 \pm 1,8	0,4	16,1	2,7
CN	4,7 (\pm 2,2)	0,7	13,3	5,0



Ryc. 15. Poziom białka ostrej fazy CRP (mg/l) w poszczególnych grupach chorych.
Fig. 15. C-reactive protein (CRP, mg/l) levels in study groups.

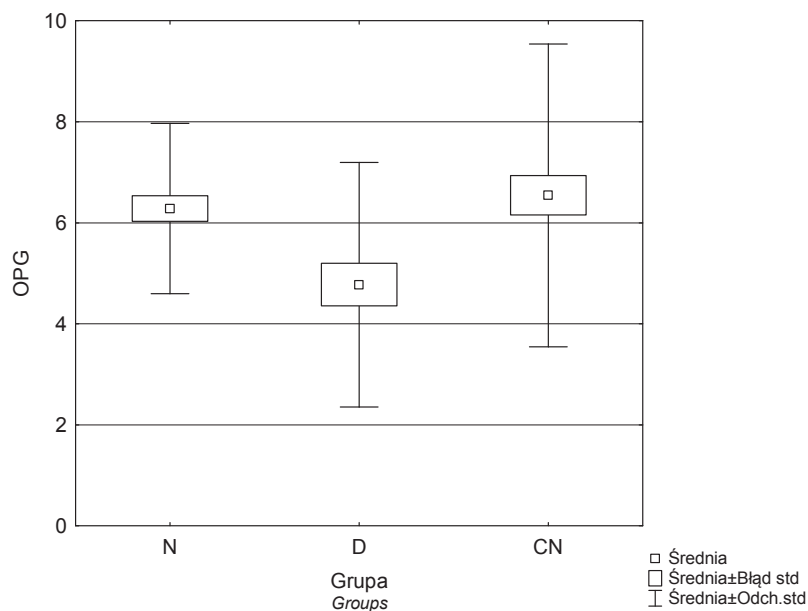
Porównując **poziomy osteoprotegeryny** (OPG) w surowicy krwi chorych we wszystkich trzech badanych grupach stwierdzono że poziom OPG w grupach pacjentów z neuropatią bez neuroosteopatii (N) oraz w grupie z neuroosteopatią Charcota (CN) jest znamienne wyższy w porównaniu z poziomem

tej cytokiny w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii. (odpowiednio $6,3 \pm 1,7$ pmol/l, $6,6 \pm 3,0$ pmol/l i $4,8 \pm 2,4$ pmol/l). Nie stwierdzono natomiast różnicy w stężeniu osteoprotegeryny pomiędzy grupą chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) a grupą chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) (grupa CN vs D $p=0,011$, N vs D $p=0,04$) (tabela 21, rycina 16).

Tabela 21. Poziom osteoprotegeryny (pmol/l) w grupach chorych.

Table 21. Osteoprotegerin levels (pmol/l) in study groups.

Grupa Group	Poziom osteoprotegeryny \pm SD <i>Osteoprotegerin levels in the study groups\pmSD</i> (pmol/l)	Min. (pmol/l)	Max (pmol/l)	Mediana <i>Median</i> (pmol/l)
N	$6,3 \pm 1,7$	3,7	10,4	6,0
D	$4,8 \pm 2,4$	1,2	10,1	4,5
CN	$6,6 \pm 3,0$	1,6	21,8	6,1



Ryc. 16. Poziomy osteoprotegeryny w grupach chorych (pmol/l).

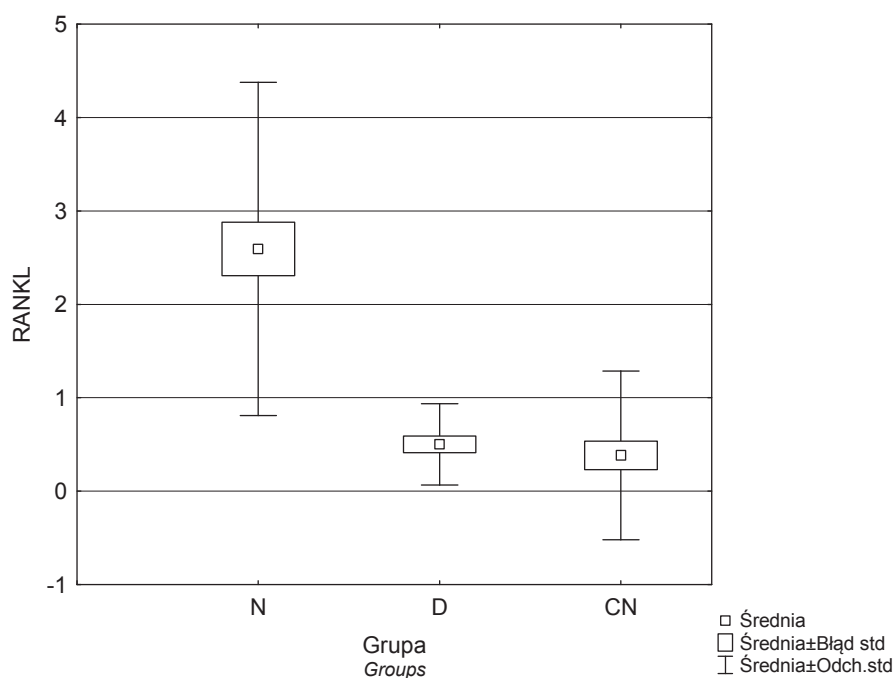
Fig. 16. Osteoprotegerin levels in study groups (pmol/l).

Poziom ligandu aktywatora receptora jądrowego czynnika κB (RANKL) w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) wynosił średnio $0,50 \pm 0,44$ pmol/l, a w grupie chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) $2,60 \pm 1,8$ pmol/l. W grupie chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) średnie stężenie RANKL było najniższe i wynosiło $0,38 \pm 0,90$ pmol/l. Poziomy RANKL we wszystkich badanych grupach różniły się istotnie (grupa CN vs N $p < 0,0001$, grupa CN vs D $p = 0,017$, grupa N vs D $p = 0,002$) (tabela 22, rycina 17).

Tabela 22. Poziomy RANKL w poszczególnych grupach.

Table 22. RANKL concentrations in study groups.

Grupa Group	Poziom RANKL \pm SD RANKL concentration \pm SD (pmol/l)	Min. (pmol/l)	Max (pmol/l)	Mediana Median (pmol/l)
N	$2,60 \pm 1,8$	0,02	6,5	2,4
D	$0,50 \pm 0,44$	0,05	1,8	0,39
CN	$0,38 \pm 0,9$	0,00	3,29	0,01



Ryc. 17. Poziomy RANKL w poszczególnych grupach (pmol/l).

Fig. 17. RANKL concentrations in study groups (pmol/l).

Stosunek stężeń OPG/RANKL w grupie pacjentów z neuroosteoartropatią Charcota (CN) wynosi $95,88 \pm 127,97$ (zakres 1,28-440,00), w grupie pacjentów z neuropatią (N) $19,18 \pm 56,96$ (zakres 0,80-337,51) a w grupie pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) $23,72 \pm 29,05$ (zakres 2,39-130,11). Dla całej badanej grupy stosunek poziomu OPG/RANKL wynosi $38,28 \pm 80,11$ (zakres 0,80-440,00). W obrębie grup występują różnice stosunku OPG/RANKL istotne statystycznie (wartość statystyki testowej Kruskala-Wallisa $H(2,82)=23,18$, $p=0,0001$). Mediana stosunku OPG/RANKL w grupie CN jest istotnie większa od mediany stosunku OPG/RANKL w grupie N oraz mediana stosunku OPG/RANKL w grupie N jest istotnie mniejsza od mediany stosunku OPG/RANKL w grupie D (tabela 23).

Tabela 23. Wartości stosunku OPG/RANKL w grupach pacjentów.

Table 23. OPG/RANKL ratio in studied groups.

	CN	N	D	Wszystkie grupy All studied groups
średnia±SD mean±SD	95,88±127,97	19,18±56,96	23,2±29,05	38,28±80,11
zakres / range	1,28-440,00	0,80-337,51	2,39-130,11	0,80-440,00
mediana / median	51,84	2,75	9,49	6,09
95%CI	[34,19;157,56]	[0,71;37,64]	[11,45;35,99]	[20,68;55,88]

5.3. Analiza polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej

Charakterystyka analizowanych polimorfizmów

W poniższej analizie zastosowano następujące oznaczenie poszczególnych polimorfizmów (zmiany w sekwencji wraz z pozycją oraz identyfikatory polimorfizmów w oparciu o bazę NCBI SNP):

Polimorfizmy genu osteoprotegeryny

245T>G (rs3134069) – polimorfizm występujący w rejonie promotorowym genu, substytucja tyminy na guaninę,

950T>C (rs2073617) – polimorfizm w rejonie promotorowym genu, substytucja tyminy na cytozynę,

- 1181G>C (rs2073618) – polimorfizm w rejonie pierwszego egzonu, substytucja guaniny na cytozynę skutkujący zamianą aminokwasu lizyny na asparginę,
1217C>T (rs3102734) – polimorfizm zlokalizowany w intronie pierwszym substytucja cytozyny na tyminę,
6890A>C (rs7844539) – polimorfizm zlokalizowany jest w intronie czwartym, substytucja adeniny na cytozynę.

Polimorfizmy genu *RANKL*

- 290C>T (rs9525641) – polimorfizm zlokalizowany jest ok 250 par zasad powyżej miejsca startu transkrypcji w rejonie niekodującym (przed miejscem startu translacji), substytucja cytozyny na tyminę,
643C>T (rs9533156) – polimorfizm zlokalizowany jest ok 1050 par zasad powyżej startu transkrypcji w rejonie niekodującym (przed miejscem startu translacji), substytucja cytozyny na tyminę,
693G>C (rs9533155) – polimorfizm zlokalizowany zlokalizowany jest ok 1000 par zasad powyżej startu transkrypcji w rejonie niekodującym (przed miejscem startu translacji), substytucja guaniny na cytozynę.

Polimorfizmy genu *RANK*

- 421C>T (rs35211496) – polimorfizm zlokalizowany w egzonie czwartym substytucja cytozyny na tyminę (nie powoduje zamiany aminokwasu)
575C>T (rs1805034) – polimorfizm zlokalizowany w egzonie szóstym substytucja cytozyny na tyminę (nie powoduje zamiany aminokwasu).

Dystrybucja genetyczna polimorfizmów dla całej badanej populacji była w większości zgodna z równowagą Hardy-Weinberga za wyjątkiem 1217C>T (*OPG*), 643C>T (*RANKL*), i 421C>T (*RANK*) (tabela 24).

Tabela 24. Równowaga Hardy-Weinberga dla poszczególnych polimorfizmów.
Table 24. Hardy-Weinberg equilibrium for studied polymorphisms.

Polimorfizm <i>Polymorphism</i>	X ²	P	Wynik / <i>Result</i>
<i>Polimorfizmy OPG / OPG polymorphisms</i>			
245T>G	0,001	0,97	zgodny / <i>in equilibrium</i>
950T>C	0,21	0,65	zgodny / <i>in equilibrium</i>
1181G>C	2,91	0,088	zgodny / <i>in equilibrium</i>
1217C>T	7,41	0,006	niezgodny / <i>in disequilibrium</i>
6890A>C	0,34	0,56	zgodny / <i>in equilibrium</i>
<i>Polimorfizmy RANKL / RANKL polymorphisms</i>			
290C>T	0,52	0,97	zgodny / <i>in equilibrium</i>
643C>T	75,0	<0,001	niezgodny / <i>in disequilibrium</i>
693G>C	0,34	0,56	zgodny / <i>in equilibrium</i>
<i>Polimorfizmy RANK / RANK polymorphisms</i>			
421C>T	8,25	0,004	niezgodny / <i>in disequilibrium</i>
575C>T	3,69	0,054	zgodny / <i>in equilibrium</i>

Częstość występowania poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów genów *OPG, RANKL i RANK*

Analizowano częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genu **osteoprotegeryny** w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej. Badane były następujące polimorfizmy: **245T>G, 950T>C, 1181G>C, 1217C>T, 6890A>C**.

Spośród wszystkich genotypów dla **polimorfizmu 245T>G** w całej badanej populacji dominowała homozygota TT, najwięcej osób z tym genotypem obserwowano w grupie kontrolnej. Heterozygoty TG występowały najczęściej w grupie chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii (N), natomiast homozygoty GG występowały rzadko – jedynie u jednego chorego na cukrzycę bez neuropatii (D) (tabela 25, rycina 18).

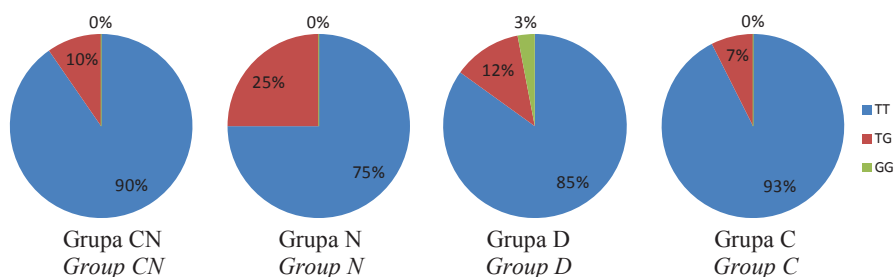
Obserwowano statystycznie znamiennej różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupą z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) a grupą z neuropatią i neuroosteartropatią Charcota (CN) ($p=0,03$) oraz pomiędzy grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C) ($p=0,004$). Nie obser-

wowano istotnej różnicy w częstości występowania genotypów pomiędzy grupami z neuropatią bez neuroosteopatii (N) i grupą z neuropatią i neuroosteopatią Charcota (CN), a grupą chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) oraz pomiędzy grupą z neuroosteopatią (CN) a grupą kontrolną (C) (tabela 26).

Tabela 25. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **245T>G** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 25. Frequency of genotypes of 245T>G osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotype	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
TT	56 (90,3%)	33 (75%)	28 (84,9%)	87 (92,6%)
TG	6 (9,7%)	11 (25%)	4 (12,1%)	7 (7,4%)
GG	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,0%)	0 (0,0%)



Ryc. 18. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **245T>G** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 18. Frequency of genotypes of 245T>G osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 26. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **245T>G** genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami.

Table 26. χ^2 test for difference in genotypes of 245T>G osteoprotegerin gene polymorphism frequency between study groups.

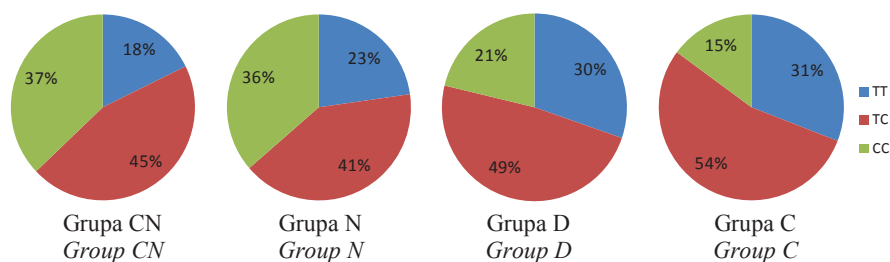
	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=4,9$ p=0,03		
D	$\chi^2=0,2$ p=0,7	$\chi^2=1,8$ p=0,2	
C	$\chi^2=0,2$ p=0,6	$\chi^2=8,1$ p=0,004	$\chi^2=0,8$ p=0,4

W badanej populacji w przypadku **polimorfizmu 950T>C** homozygota TT oraz heterozygota T/C występowały najczęściej w grupie kontrolnej (C), najczęściej homozygot C/C stwierdzono w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) (tabela 27, rycina 19). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w częstości występowania polimorfizmów 950T>C genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami z neuropatią bez neuroosteopatii (N) oraz z neuroosteopatią Charcota (CN) i chorych na cukrzycę bez neuropatii (D). Znamiennej statystycznie różnicę stwierdzono natomiast pomiędzy grupami: z neuroosteopatią Charcota i neuropatią a grupą kontrolną (CN vs C $p=0,004$ i N vs C $p=0,017$) (tabela 28).

Tabela 27. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **950T>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 27. Frequency of genotypes of **950T>C** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
T/T	11 (17,7%)	10 (22,7%)	10 (30,3%)	29 (30,9%)
T/C	28 (45,2%)	18 (40,9%)	16 (48,5%)	51 (54,2%)
C/C	23 (37,1%)	16 (36,4%)	7 (21,2%)	14 (14,9%)



Ryc. 19. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **950T>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 19. Frequency of **950T>C** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups.

Tabela 28. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **950T>C** genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami.

Table 28. χ^2 test for difference in genotypes of **950T>C** osteoprotegerin gene polymorphism frequency between study groups.

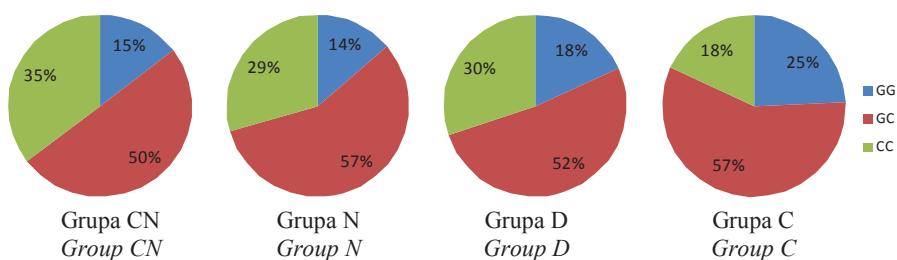
	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=0,4$ p=0,8		
D	$\chi^2=3,3$ p=0,2	$\chi^2=2,1$ p=0,3	
C	$\chi^2=10,9$ p=0,004	$\chi^2=8,12$ p=0,017	$\chi^2=0,75$ p=0,69

W przypadku **polimorfizmu 1181G>C** genotyp G/G występował z największą częstością w grupie kontrolnej (C). Również najczęściej heterozygot G/C obserwowano w tej grupie, natomiast homozygota C/C występowała najczęściej u osób w grupie z neuroosteopatią Charcota (CN) (tabela 29, rycina 20).

Tabela 29. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **1181G>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 29. Frequency of genotypes of **1181G>C** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
G/G	9 (14,5%)	6 (13,6%)	6 (18,2%)	23 (24,5%)
G/C	31 (50%)	25 (56,8%)	17 (51,5%)	54 (57,4%)
C/C	22 (35,5%)	13 (29,5%)	10 (30,3%)	17 (18,1%)



Ryc. 20. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **1181G>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 20. Frequency of genotypes of **1181G>C** OPG gene polymorphism in study groups and control.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 1181G>C pomiędzy grupami chorych CN, N i D. Statystycznie znamiennej różnicy występowała w częstości występowania genotypów pomiędzy grupą CN a C ($p=0,035$) (tabela 30).

Tabela 30. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu 1181G>C genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami.

Table 30. χ^2 test for difference in genotypes of 1181G>C osteoprotegerin gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=0,5$ $p=0,8$		
D	$\chi^2=0,4$ $p=0,8$	$\chi^2=0,4$ $p=0,8$	
C	$\chi^2=6,7$ $p=0,035$	$\chi^2=3,5$ $p=0,2$	$\chi^2=2,3$ $p=0,3$

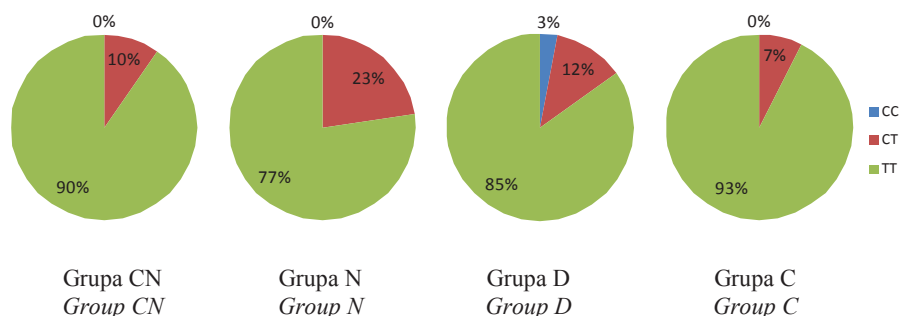
Analiza częstości występowania polimorfizmu 1217C>T wykazała, że heterozygoty C/T dominowały w grupie chorych z neuropatią bez neuroosteopropatii (N). Homozygota T/T z największą częstością występowała w grupie kontrolnej (C). Homozygoty C/C stanowiły rzadki genotyp- stwierdzono go tylko u jednej osoby w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) (tabela 31, rycina 21).

Istotną różnicę w rozkładzie genotypów obserwowano pomiędzy grupą chorych z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C) ($p=0,01$) (tabela 32).

Tabela 31. Częstość występowania genotypów polimorfizmu 1217C>T genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 31. Frequency of genotypes of 1217G>T osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
C/C	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)
C/T	6 (9,7%)	10 (22,7%)	4 (12,1%)	7 (7,4%)
T/T	56 (90,3%)	34 (77,3%)	28 (84,8%)	87 (92,6%)



Ryc. 21. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **1217C>T** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 21. Frequency of genotypes of **1217C>T** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 32. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **1217C>T** genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami.

Table 32. χ^2 test for difference in genotypes of **1217C>T** osteoprotegerin gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=3,4$ p=0,06		
D	$\chi^2=0,2$ p=0,7	$\chi^2=1,3$ p=0,3	
C	$\chi^2=0,2$ p=0,6	$\chi^2=6,5$ p=0,01	$\chi^2=0,8$ p=0,4

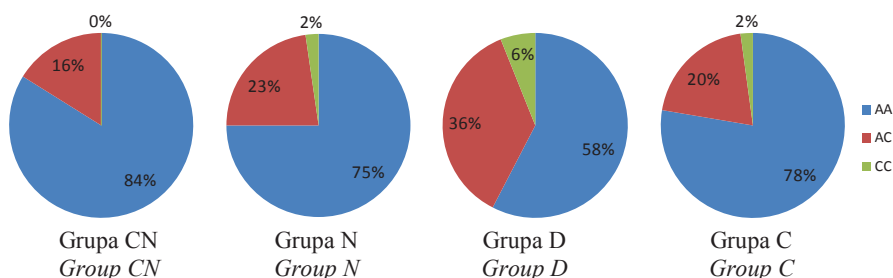
Badając **polimorfizm 6890A>C** stwierdzono największą częstość występowania homozygoty A/A w grupie chorych z neuroosteartropatią (CN), heterozygota A/C występowała najczęściej w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D), homozygota C/C występowała w grupach z z neuropatią bez neuroosteartropatii (N), chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) oraz w grupie kontrolnej (C) (ale był to genotyp rzadki obserwowany tylko u – odpowiednio –2,3%, 6,1% i 2,1% osób w każdej z grup), obecności tego genotypu nie stwierdzano go natomiast w grupie chorych z neuroosteartropatią (CN) (tabela 33, rycina 22).

Stwierdzono znamienne różnicę w rozkładzie genotypów polimorfizmu 6890A>C pomiędzy grupą CN a D (p=0,02) oraz pomiędzy grupą D a kontrolą C (p=0,045). Nie było istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupami CN i N, CN i C oraz N i C (tabela 34).

Tabela 33. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **6890A>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 33. Frequency of genotypes of **6890A>C** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
A/A	52 (83,9%)	33 (75%)	19 (57,5%)	73 (77,7%)
A/C	10 (16,1%)	10 (22,7%)	12 (36,4%)	19 (20,2%)
C/C	0 (0%)	1 (2,3%)	2 (6,1%)	2 (2,1%)



Ryc. 22. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **6890A>C** genu osteoprotegeryny w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 22. Frequency of genotypes of **6890A>C** osteoprotegerin gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 34. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **6890A>C** genu osteoprotegeryny pomiędzy grupami.

Table 34. χ^2 test for difference in genotypes of **6890A>C** osteoprotegerin gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=0,8$ p=0,4		
D	$\chi^2=5,8$ p=0,02	$\chi^2=2,1$ p=0,2	
C	$\chi^2=0,5$ p=0,5	$\chi^2=0,1$ p=0,7	$\chi^2=4,0$ p=0,045

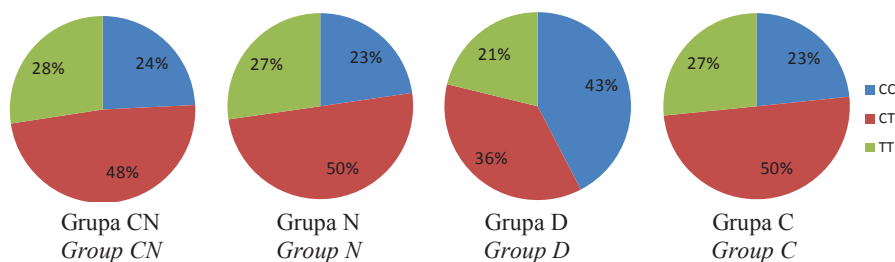
Następnie zbadano częstość występowania poszczególnych **polimorfizmów genu *RANKL*** w poszczególnych grupach chorych i w grupie kontrolnej. Badane były polimorfizmy: **290C>T**, **643C>T**, **693G>C**.

Analizując **polimorfizm 290C>T** stwierdzono, że homozygota C/C występowała najczęściej w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii (D), heterozygota – w grupie chorych z neuropatią (N) oraz w grupie kontrolnej (C) a homozygota TT w grupie pacjentów z neuroosteopatią (CN) i neuropatią bez neuroosteopatii (N) (tabela 35, rycina 23).

Tabela 35. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **290C>T** genu *RANKL* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 35. Frequency of genotypes of **290C>T** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
C/C	15 (24,2%)	10 (22,7%)	14 (42,4%)	22 (23,4%)
C/T	30 (48,4%)	22 (50%)	12 (36,4%)	47 (50%)
T/T	17 (27,4%)	12 (27,3%)	7 (21,2%)	25 (26,6%)



Ryc. 23. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **290C>T** genu *RANKL* w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 23. Frequency of genotypes of **290C>T** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 36. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **290C>T** genu *RANKL* pomiędzy grupami.

Table 36. χ^2 test for difference in genotypes of **290C>T** *RANKL* gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN	X		
N	$\chi^2=0,04$ p=1,0	X	
D	$\chi^2=3,4$ p=0,2	$\chi^2=3,4$ p=0,2	X
C	$\chi^2=0,04$ p=1,0	$\chi^2=0,04$ p=1,0	$\chi^2=4,4$ p=0,1

Nie obserwowano istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupami (tabela 36).

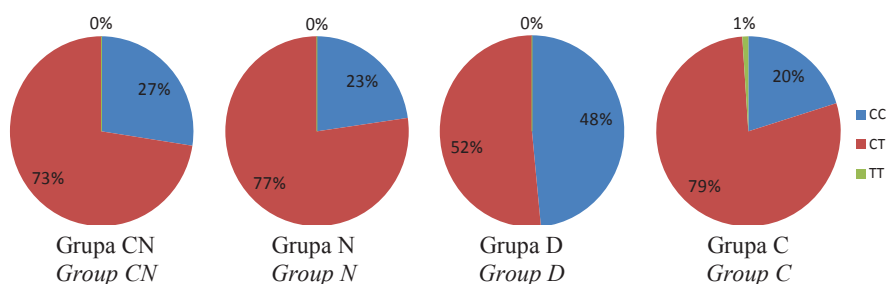
W przypadku **polimorfizmu 643C>T** homozygoty C/C oraz heterozygoty C/T stwierdzono zarówno w grupach chorych jak i w grupie kontrolnej (C). Homozygoty C/C występowały najczęściej w grupie chorych na cukrzycę (D) a heterozygoty w grupie kontrolnej (C). Występowanie homozygoty T/T obserwowano tylko u 1 osoby z grupy kontrolnej. W żadnej z grup chorych na cukrzycę pacjentów bez neuropatii (D), z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) ani w grupie z neuroosteartropatią (CN) ten genotyp nie występował (tabela 37, rycina 24).

Rozkład genotypów polimorfizmu 643C>T różnił się istotnie pomiędzy grupą CN a grupą D ($p=0,04$), grupą N i grupą D ($p=0,02$) oraz pomiędzy grupą D i kontrolą C ($p=0,002$). Nie obserwowano różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupami CN i N, CN i C oraz N i C (tabela 38).

Tabela 37. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **643C>T** genu *RANKL* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 37. Frequency of genotypes of **643C>T** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
C/C	17 (27,4%)	10 (22,7%)	16 (48,5%)	19 (20,2%)
C/T	45 (72,6%)	34 (77,3%)	17 (51,5%)	74 (78,7%)
T/T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,1%)



Ryc. 24. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **643C>T** genu *RANKL* w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 24. Frequency of genotypes of **643C>T** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 38. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **643C>T** genu *RANKL* pomiędzy grupami.

Table 38. χ^2 test for difference in genotypes of **643C>T** *RANKL* gene polymorphism frequency between study groups.

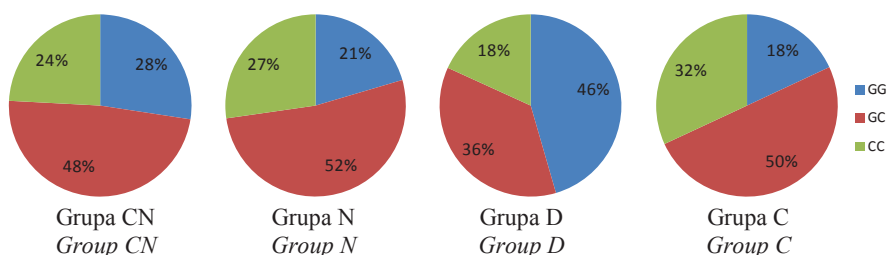
	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=0,3$ p=0,6		
D	$\chi^2=4,2$ p=0,04	$\chi^2=5,6$ p=0,02	
C	$\chi^2=1,0$ p=0,3	$\chi^2=0,1$ p=0,8	$\chi^2=10,0$ p=0,002

Spośród genotypów **polimorfizmu 693G>C** homozygota G/G występowała najczęściej w grupie chorych bez neuropatii (D), heterozygota G/C w grupie chorych z neuropatią (N), zaś homozygotę C/C stwierdzano najczęściej w grupie kontrolnej (C) (tabela 39, rycina 25). Znamiennej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów występowała tylko pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C).

Tabela 39. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **693G>C** genu *RANKL* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 39. Frequency of genotypes of **693G>C** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
G/G	17 (27,4%)	9 (20,5%)	15 (45,4%)	17 (18,1%)
G/C	30 (48,4%)	23 (52,2%)	12 (36,4%)	47 (50%)
C/C	15 (24,2%)	12 (27,3%)	6 (18,2%)	30 (31,9%)



Ryc. 25. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **693G>C** genu *RANKL* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 25. Frequency of genotypes of **693G>C** *RANKL* gene polymorphism in study groups and control.

Pomiędzy pozostałymi grupami nie było istotnych różnic w rozkładzie genotypów (tabela 40).

Tabela 40. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **693G>C** genu *RANKL* pomiędzy grupami.

Table 40. χ^2 test for difference in genotypes of **693G>C** *RANKL* gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN	 		
N	$\chi^2=0,7$ p=0,7	 	
D	$\chi^2=3,1$ p=0,2	$\chi^2=5,6$ p=0,06	
C	$\chi^2=2,3$ p=0,3	$\chi^2=0,3$ p=0,8	$\chi^2=9,9$ p=0,007

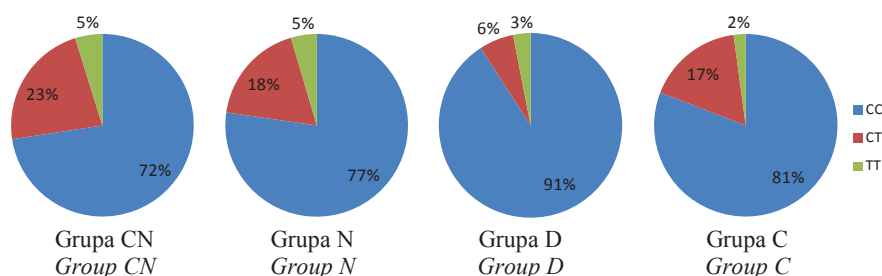
W kolejnym etapie pracy analizowano częstość występowania poszczególnych genotypów **polimorfizmu genu *RANK*** w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej. Badane były następujące polimorfizmy: **421C>T**, **575C>T**.

Analizując rozkład genotypów **polimorfizmu 241C>T** genu *RANK* wykazano że we wszystkich badanych grupach najczęściej występował genotyp homozygotyczny C/C. W grupie osób z cukrzycą bez neuropatii (D) genotyp ten występował u ponad 90% osób. Heterozygoty C/T występowały najczęściej w grupie osób z neuroosteopatią (CN), najrzadziej w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) natomiast homozygoty T/T obserwowano najczęściej w grupie z neuroosteopatią, był to jednak genotyp rzadki występujący jedynie u 1-3% badanych osób (tabela 41, rycina 26). Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w rozkładzie polimorfizmów pomiędzy grupą z neuroosteopatią (CN) oraz grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) (p=0,04). Nie obserwowano różnic w rozkładzie polimorfizmów pomiędzy pozostałymi badanymi grupami (tabela 42).

Tabela 41. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **421C>T** genu *RANK* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Table 41. Frequency of genotypes of **421C>T** *RANK* gene polymorphism in study groups and control.

Genotyp Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
C/C	45 (72,6%)	34 (77,3%)	30 (90,9%)	76 (80,9%)
C/T	14 (22,6%)	8 (18,2%)	2 (6,1%)	16 (17%)
T/T	3 (4,8%)	2 (4,5%)	1 (3%)	2 (2,1%)



Ryc. 26. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **421C>T** genu *RANK* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.

Fig. 26. Frequency of genotypes of **421C>T** *RANK* gene polymorphism in study groups and control.

Tabela 42. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **421C>T** genu *RANK* pomiędzy grupami.

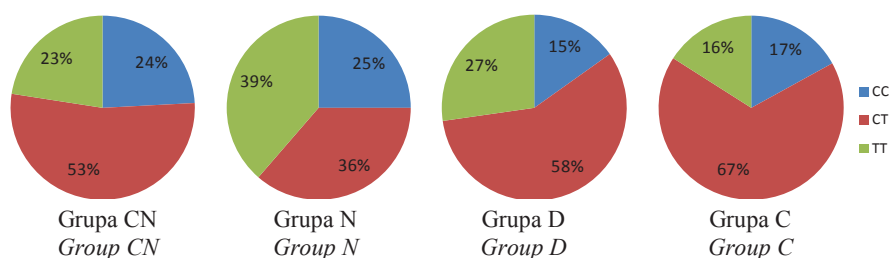
Table 42. χ^2 test for difference in genotypes of **421C>T** *RANK* gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN			
N	$\chi^2=0,3$ p=0,6		
D	$\chi^2=4,4$ p=0,04	$\chi^2=2,5$ p=0,1	
C	$\chi^2=0,9$ p=0,3	$\chi^2=0,1$ p=0,5	$\chi^2=2,4$ p=0,1

Spośród wszystkich genotypów **polimorfizmu 575C>T** homozygota C/C występowała ze zbliżoną częstością w grupach chorych z neuroosteopatią i neuropatią (CN i N), heterozygota C/T występowała najczęściej w grupie kontrolnej (C), natomiast homozygotę T/T obserwowano najczęściej w grupie chorych z neuropatią bez neuroosteopatii (N) (tabela 43, rycina 27). Istotną różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu **575C>T** stwierdzono tylko pomiędzy grupą N a grupą kontrolną C (p=0,002). Pomędzy pozostałymi grupami nie stwierdzano statystycznie znamiennej różnic (tabela 44).

Tabela 43. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **575C>T** genu *RANK* w grupach chorych i w grupie kontrolnejTable 43. Frequency of genotypes of **575C>T** *RANK* gene polymorphism in study groups and control.

Genotypy Genotypes	CN (%)	N (%)	D (%)	C (%)
C/C	15 (24,2%)	11 (25%)	5 (15,1%)	16 (17%)
C/T	33 (53,2%)	16 (36,4%)	19 (57,6%)	63 (67%)
T/T	14 (22,6%)	17 (38,6%)	9 (27,3%)	15 (16%)

Ryc.27. Częstość występowania genotypów polimorfizmu **575C>T** genu *RANK* w grupach chorych i w grupie kontrolnej.Fig.27 Frequency of genotypes of **575C>T** *RANK* gene polymorphism in study groups and control.Tabela 44. Test χ^2 dla różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **575C>T** genu *RANK* pomiędzy grupami.Table 44. χ^2 test for difference in genotypes of **575C>T** *RANK* gene polymorphism frequency between study groups.

	CN	N	D
CN	X		
N	$\chi^2=3,9$ p=0,1	X	
D	$\chi^2=1,1$ p=0,6	$\chi^2=3,5$ p=0,2	X
C	$\chi^2=3,0$ p=0,2	$\chi^2=12,5$ p=0,002	$\chi^2=2,0$ p=0,4

5.3.1. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *OPG*

Następnie dokonano analizy występowania nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów. Szczegółowe wyniki analizy sprzężeń dla poszczególnych polimorfizmów zawarte są w aneksie 11.3.

Niezrównoważenie sprzężeń (LD) w genie *OPG* w grupie pacjentów z **neuroosteoartropatią Charcota**(CN) obejmuje 5 polimorfizmów: 245T>G, 950T>C, 1181G>C, 1217C>T, 6890A>C. W przypadku wszystkich

pięciu polimorfizmów otrzymano wartość p wskazującą na znamienność statystyczną, co świadczy o silnym niezrównoważeniu sprzężeń w tej grupie chorych, przy czym dla 2 polimorfizmów wartość p wynosiła $<2,22 \cdot 10^{-16}$ (245T>G i 1217C>T, 950T>C i 1181G>C) a dla jednej pary 950T>C i 6890A>C wartość p wynosiła $6,131825 \cdot 10^{-5}$, co przemawia za bardzo wysokim LD. W przypadku trzech par (1181G>C i 6890A>C, 1217C>T i 6890A>C a także 245T>G i 6890A>C) otrzymano wartości p wskazujące na brak znamienności statystycznej, co wskazuje na brak powiązania tych par polimorfizmów w genie OPG u pacjentów z neuroosteartropatią Charcota.

Niezrównoważenie sprzężeń w genie *OPG* w grupie pacjentów z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) również obejmuje 5 polimorfizmów z wartością p wskazującą na znamienność statystyczną 245T>G, 950T>C, 1181G>C, 1217C>T, 6890A>C. Dla 3 par polimorfizmów w tej grupie badanych wartość p nie osiągnęła progu znamienności statystycznej (245T>G i 6890A>C, 1181G>C i 6890A>C oraz 1217C>T i 6890A>C). Pozostałe pary były w silnej nierównowadze sprzężeń: 245T>G i 1181G>C ($p=3,185454 \cdot 10^{-5}$), 245T>G i 1217C>T ($p < 2,2204 \cdot 10^{-16}$), 950T>C i 1181G>C ($p=2,116397 \cdot 10^{-6}$), 950T>C i 6890A>C ($p=1,932602 \cdot 10^{-5}$), 1181G>C i 1217C>T ($p=8,117109 \cdot 10^{-5}$). Dla dwóch par 245T>G i 950T>C oraz 950T>C i 1217C>T obserwowano słabszą nierównowagę sprzężeń (odpowiednio $p=0,002$ i $p=0,003$).

Analiza w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) także wykazała występowanie nierównowagi sprzężeń dla wszystkich badanych polimorfizmów genu osteoprotegeryny, wartość p osiągnęła znamienność statystyczną w przypadku 3 par 245T>G i 1217C>T ($p=3,52882 \cdot 10^{-7}$), 6890A>C i 950T>C ($p=2,75137 \cdot 10^{-5}$) oraz 1181G>C i 1217C>T ($p=0,0037$).

W grupie kontrolnej w nierównowadze sprzężeń znajdowały się wszystkie polimorfizmy genu osteoprotegeryny, przy czym znamiennej wartości statystycznej osiągnięto dla siedmiu par polimorfizmów, w tym dla trzech par niezrównoważenie sprzężeń było silne: 245T>G i 1181G>C oraz 950T>C i 1217C>T wartość p wynosiła $< 2,2204 \cdot 10^{-16}$ a dla pary 950T>C i 6890A>C $p < 1,33684 \cdot 10^{-5}$.

5.3.2. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *RANKL*

W grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) znamiennej statystycznie nierównowagę sprzężeń w genie *RANKL* wykazano dla trzech analizowanych polimorfizmów (290C>T, 643C>T i 693G>C). Nierównowaga sprzężeń była bardzo wysoka w przypadku wszystkich trzech par 290C>T i 643C>T ($p=1,942890 \cdot 10^{-14}$), 290C>T i 693G>C ($p<2,2204 \cdot 10^{-16}$) oraz 643C>T i 693G>C ($p<2,2204 \cdot 10^{-16}$)

Również w badanej populacji **chorych z neuropatią bez neuroosteopatii (N)** nierównowaga sprzężeń obejmowała wszystkie trzy polimorfizmy i była istotna statystycznie w przypadku wszystkich trzech par: 290C>T i 643C>T ($p=2,559366 \cdot 10^{-9}$), 290C>T i 693G>C ($p=2,035039 \cdot 10^{-13}$), 643C>T i 693G>C ($p=3,660849 \cdot 10^{-12}$)

W grupie pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) podobnie jak w grupie CN w nierównowadze sprzężeń znajdowały się wszystkie 3 polimorfizmy genu *RANKL*. 290C>T i 643C>T ($p=2,982757 \cdot 10^{-9}$), 290C>T i 693G>C ($p=7,805956 \cdot 10^{-11}$) oraz 643C>T i 693G>C ($p=2,493037 \cdot 10^{-10}$)

W grupie kontrolnej (C) także wykazano nierównowagę sprzężeń wszystkich analizowanych polimorfizmów z istotną statystycznie LD dla trzech par. W tej grupie obserwowano bardzo wysoką wartość LD w przypadku wszystkich trzech par: 643C>T i 693G>C ($p<2,2204 \cdot 10^{-16}$), 290C>T i 643C>T ($p=1,191148 \cdot 10^{-8}$), 290C>T i 693G>C ($p=5,551115 \cdot 10^{-15}$).

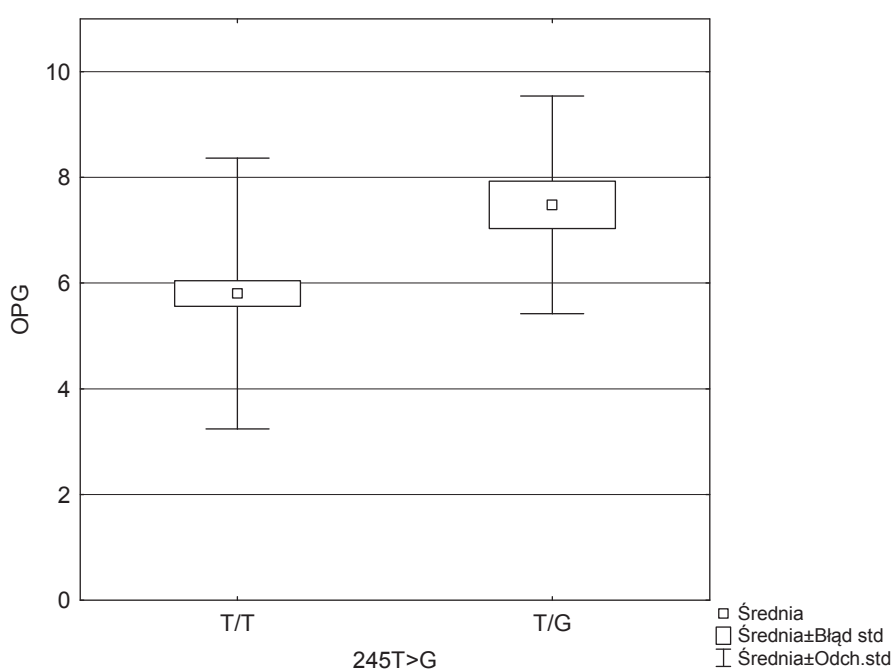
5.3.3. Niezrównoważenie sprzężeń w genie *RANK*

Dla grupy chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) oraz pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) stwierdzono losowy rozkład badanych polimorfizmów 421C>T i 575C>T (odpowiednio $p=0,05$ i $p=0,59$) co wskazuje na brak sprzężenia polimorfizmów w genie *RANK* w tych grupach.

W grupach pacjentów z neuropatią bez neuroosteopatii (N) i **w grupie kontrolnej (C)** stwierdzano istotną statystycznie nierównowagę sprzężeń (odpowiednio $p=0,012$ i $p=1,801428 \cdot 10^{-6}$).

5.4. Występowanie poszczególnych polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* a stężenie *OPG* i *RANKL* w osoczu w badanych grupach chorych

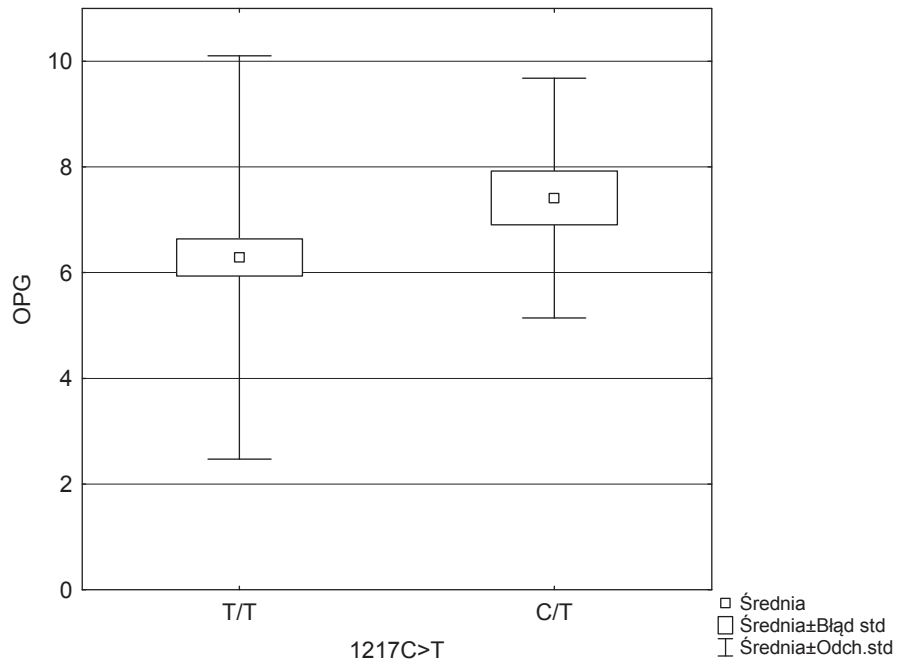
Występowanie poszczególnych polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* a stężenie *OPG* w osoczu w badanych grupach chorych (łącznie)



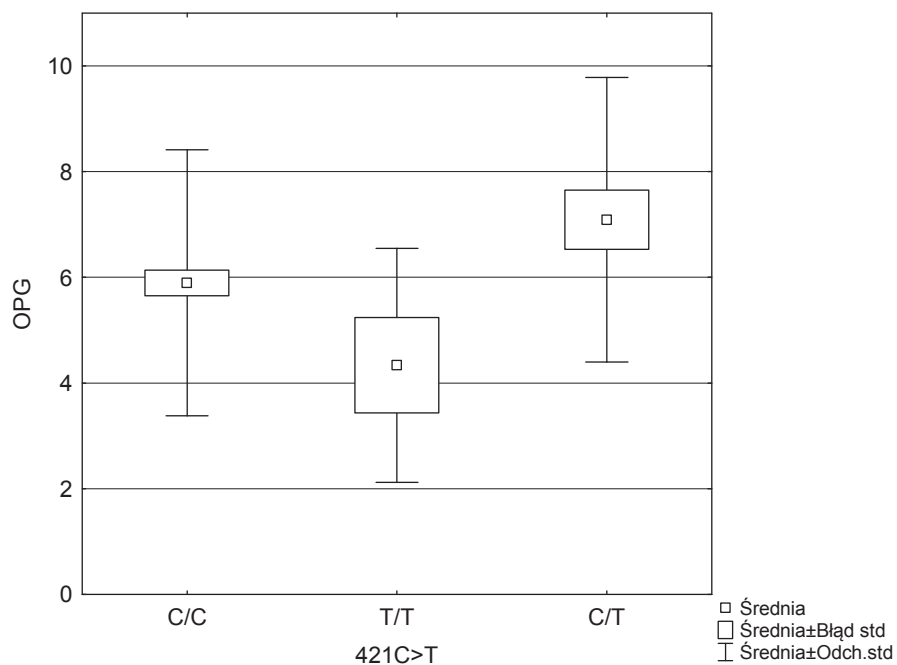
Ryc. 28. Stężenia osteoprotegeryny (pmol/l) a poszczególne genotypy polimorfizmu 245T>G genu *OPG* dla analizowanej grupy chorych (CN, N i D) (genotyp G/G występował tylko u jednej osoby w badanej grupie).

Fig. 28. Osteoprotegerin concentration (pmol/l) in relation to genotypes of 245T>G *OPG* gene polymorphism in the study group (CN, N and D) (genotype G/G was found only in one subject).

Dla całej badanej grupy chorych stwierdzono istotnie wyższy poziom osteoprotegeryny u osób z genotypem T/G polimorfizmu 245T>G ($p=0,005$) w genie *OPG* (rycina 28), genotypem C/T polimorfizmu 1217C>T ($p=0,045$) genu osteoprotegeryny (rycina 29) oraz genotypem C/T polimorfizmu 421C>T ($p=0,047$) genu *RANK* (rycina 30). Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu osteoprotegeryny w osoczu dla żadnego z poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *RANKL*.



Ryc. 29. Stężenie osteoprotegeryny (pmol/l) a poszczególne genotypy polimorfizmu 1217C>T genu *OPG* dla analizowanej grupy chorych (CN, N i D).
Fig. 29. Osteoprotegerin concentration (pmol/l) in relation to genotypes of 1217C>TOPG gene polymorphism in the study group (CN, N and D).

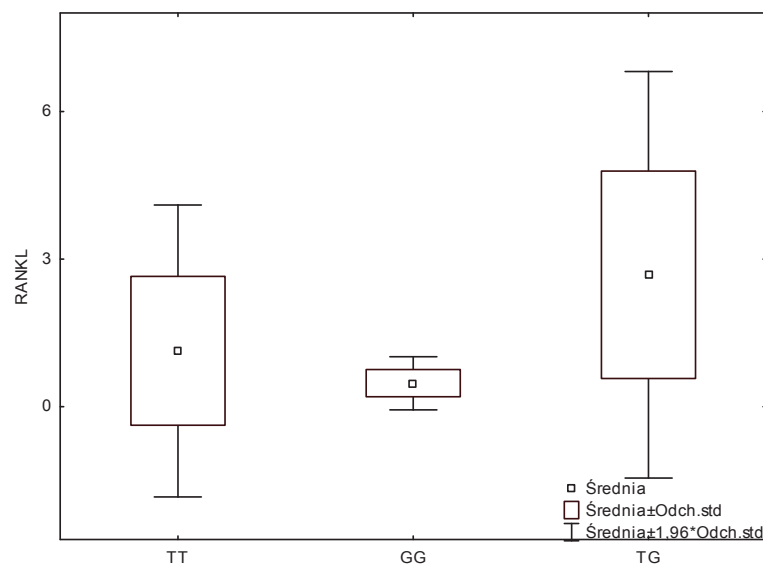


Ryc. 30. Stężenie osteoprotegeryny (pmol/l) a poszczególne genotypy polimorfizmu 421C>T genu RANK dla analizowanej grupy chorych (CN, N i D).

Fig. 30. Osteoprotegerin concentration (pmol/l) in relation to genotypes of 421C>T RANK gene polymorphism in the study group (CN, N and D).

Występowanie polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* a stężenie RANKL w osoczu w badanych grupach chorych (łącznie).

Dla całej badanej grupy chorych stwierdzono istotnie wyższy poziom RANKL jedynie u osób z genotypem T/G polimorfizmu 245T>G genu osteoprotegeryny. Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu RANKL w osoczu dla żadnego z poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *RANKL* i *RANK*.



Ryc. 31. Poziom RANKL (pmol/l) a poszczególne genotypy polimorfizmu 245T>G genu *OPG* dla analizowanej grupy chorych (CN, N i D).

Fig. 31. Mean RANKL concentration (pmol/l) in relation to genotypes of 245T>G *OPG* gene polymorphism in the study group (CN, N and D).

Tabele przedstawiające szczegółowe wyniki analiz znajdują się w aneksie.

Występowanie polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* a stężenie *OPG* i *RANKL* w osoczu w poszczególnych grupach.

W analizie przeprowadzonej w poszczególnych badanych grupach wykazano istotne różnice w **średnim stężeniu osteoprotegeryny** jedynie w grupach chorych z neuropatią (CN i N). W przypadku polimorfizmu 245T>G genu *OPG* w grupie pacjentów z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) obserwowano istotnie wyższy poziom osteoprotegeryny u osób z genotypem TG w porównaniu z genotypem TT (odpowiednio $7,34 \pm 1,85$ pmol/l i $5,92 \pm 1,51$ pmol/l ($p=0,043$)). W tej samej grupie chorych stwierdzono znamienne wyższy poziom *OPG* u pacjentów z genotypem CT w porównaniu z genotypem TT (genotyp CC nie występował) polimorfizmu 1217C>T genu *OPG* (odpowiednio $7,42 \pm 1,93$ pmol/l i $5,94 \pm 1,49$ pmol/l, $p=0,044$). W grupie pacjentów z neuroosteartropatią Charcota (CN) wykazano istotną różnicę poziomu osteoprotegeryny tylko dla polimorfizmu 950T>C genu *OPG*. W przypadku genotypu TC stężenie osteoprotegeryny było najwyższe i wynosiło $8,97 \pm 6,04$ pmol/l, a w przypadku pozostałych genotypów CC i TT odpowiednio $6,33 \pm 2,8$ pmol/l i $5,24 \pm 2,19$ pmol/l ($p=0,033$).

Analiza **stężenia RANKL** w badanych grupach chorych wykazała istotne różnice średniego stężenia tej cytokiny tylko w grupie pacjentów z neuropatią dla polimorfizmu 421C>T genu *RANK*. Stężenie RANKL było najwyższe u osób z genotypem TT ($3,15 \pm 0,92$ pmol/l), a u osób z genotypami CC i CT wynosiło odpowiednio $2,97 \pm 1,72$ pmol/l i $1,16 \pm 1,37$ pmol/l (ANOVA=0,042). Dla pozostałych grup i polimorfizmów nie obserwowano różnic w stężeniu OPG i RANKL.

5.5. Analiza regresji logistycznej

Analizie poddano chorych na cukrzycę z neuropatią (N) i oceniono wpływ poszczególnych czynników na rozwój neuroosteartropatii (CN). Następnie analizowano grupę chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) oceniając związek analizowanych parametrów z rozwojem neuropatii (N) oraz neuroosteartropatii Charcota (CN).

Analiza regresji logistycznej dla grupy chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) oraz chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii (N)

Na podstawie analizy regresji logistycznej, w której zmienną zależną była dychotomiczna zmienna przyjmująca wartości 1 albo 0 odpowiednio dla neuroosteartropatii Charcota (CN) oraz neuropatii bez neuroosteartropatii (N) stwierdzono, że **czynnikami, które miały statystycznie istotny ($p < 0,05$) związek z rozwojem neuroosteartropatii Charcota były:**

- **wiek chorych (OR=0,90 [95% CI 0,84-0,96], $p=0,0013$),**
- **czas trwania cukrzycy (OR=0,93 [95% CI 0,87-1,00], $p=0,036$)**
- **występowanie retinopatii (OR=4,50 [95% CI 1,00-14,40], $p=0,012$),**
- **poziom CRP (OR=1,57 [1,21-2,04], $p=0,001$)**
- **polimorfizm 245T>G genu *OPG* (obecność polimorfizmu TG OR=0,14 [0,029-0,72], $p=0,02$),**

gdzie OR to jednostkowy iloraz szans (tabela 45).

Inne analizowane parametry, w tym płeć, BMI, typ cukrzycy, poziom HbA1c, występowanie nefropatii, poziom OPG i RANKL oraz pozostałe polimorfizmy, okazały się nieistotne na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Tabela 45. Podsumowanie analizy regresji logistycznej z dychotomiczną zmienną zależną 1/0 odpowiednio dla grupy chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) oraz grupy chorych z neuropatią bez neuroosteopatii (N).

Table 45. Summary of regression analysis with dependent variable 1 for Charcot neuroosteoarthropathy (CN) and 0 for neuropathy without neuroosteoarthropathy (N).

	Polimorfizm 245T>G 245T>G <i>polymorphism</i>	Wiek <i>Age</i>	Czas trwania cukrzycy <i>Diabetes duration</i>	Retinopatia <i>Retinopathy</i>	CRP
Ocena <i>Estimate</i>	-1,9	-0,10	-0,07	1,5	0,45
Błąd standardowy <i>Standard error</i>	0,8	0,03	0,03	0,58	0,13
t(99)	-2,3	-3,3	-2,1	2,5	3,4
P	0,02	0,0013	0,036	0,012	0,001
Iloraz szans <i>Odds ratio</i>	0,144	0,900	0,930	4,503	1,570
-95%CI	0,028	0,840	0,870	1,408	1,209
+95%CI	0,723	0,957	0,995	14,40	2,039

Analiza regresji logistycznej dla grupy chorych na cukrzycę z neuroosteopatią Charcota (CN) oraz grupy chorych na cukrzycę bez neuropatii (D)

Na podstawie analizy regresji logistycznej, w której zmienną zależną była dychotomiczna zmienna przyjmująca wartości 1 albo 0 odpowiednio dla neuroosteopatii Charcota (CN) oraz cukrzycy bez neuropatii (D) stwierdzono, że **czynnikami, które miały statystycznie istotny ($p < 0,05$) związek z rozwojem neuroosteopatii Charcota były:**

- **poziom HbA1c (OR=2,42 [95% CI 1,24-4,72], $p=0,01$)**
- **występowanie retinopatii (OR=58,8 [95% CI 6,5-531], $p=0,0004$)**
- **poziom CRP (OR=2,06 [1,16-3,66], $p=0,01$)**

gdzie OR to jednostkowy iloraz szans (tabela 46).

Inne analizowane parametry, takie jak: wiek, BMI, czas trwania oraz typ cukrzycy, występowanie nefropatii, poziom OPG i RANKL oraz wszystkie badane polimorfizmy okazały się nieistotne na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Tabela 46. Podsumowanie analizy regresji logistycznej z dychotomiczną zmienną zależną 1/0 odpowiednio dla grupy chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) oraz grupy chorych z cukrzycą bez neuropatii (D).

Table 46. Summary of regression analysis with dependent variable 1 for Charcot neuroosteoarthropathy (CN) and 0 for diabetes without neuropathy (D).

	Płeć żeńska <i>Female</i>	HbA1c	Retinopatia <i>Retinopathy</i>	CRP
Ocena <i>Estimate</i>	-2,1	0,89	4,1	0,72
Błąd standardowy <i>Standard error</i>	1,0	0,34	1,1	0,29
t(89)	-2,0	2,6	3,7	2,5
P	0,046	0,01	0,0004	0,01
Iloraz szans z. jedn. <i>Odds ratio</i>	0,130	2,424	58,816	2,06
-95%CI	0,017	1,24	6,52	1,16
+95%CI	0,967	4,72	530,94	3,66

Analiza regresji logistycznej dla grupy chorych na cukrzycę z neuropatią (N) oraz grupy chorych na cukrzycę bez neuropatii (D)

Na podstawie analizy regresji logistycznej, w której zmienną zależną była dychotomiczna zmienna 1/0 odpowiednio dla neuropatii (N) oraz cukrzycy bez neuropatii (D) stwierdzono, że **czynnikami, które miały statystycznie istotny ($p < 0,05$) związek z rozwojem neuropatii były:**

- **obecność retinopatii (OR=10,90 [95% CI 1,35-87,640], $p=0,025$),**
- **poziom OPG (OR=1,85 [95% CI 1,12-3,04], $p=0,017$)**
gdzie OR to jednostkowy iloraz szans (tabela 47).

Inne analizowane parametry takie płeć, wiek, BMI, czas trwania i typ cukrzycy, poziom HbA1c, występowanie retinopatii i nefropatii, poziom CRP, OPG i RANKL oraz wszystkie analizowane polimorfizmy okazały się nieistotne na poziomie istotności $\alpha=0,05$

Tabela 47. Podsumowanie analizy regresji logistycznej z dychotomiczną zmienną zależną 1/0 odpowiednio dla grupy chorych z neuropatią (N) oraz grupy chorych cukrzycą bez neuropatii (D).
Table 47. Summary of regression analysis with dependent variable 1 for neuropathy (N) and 0 for diabetes without neuropathy(D).

	Retinopatia <i>Retinopathy</i>	OPG
Ocena <i>Estimate</i>	2,4	0,61
Błąd standardowy <i>Standard error</i>	1,04	0,25
t(73)	2,3	2,4
p	0,025	0,01
Iloraz szans z. jedn. <i>Odds ratio</i>	10,90	1,85
-95%CI	1,354	1,120
+95%CI	87,641	3,040

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

6.1. Charakterystyka grup badanych

Badania dotyczyły 139 chorych na cukrzycę oraz 94 z osób z grupy kontrolnej (C). Grupa chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) liczyła 62 pacjentów, w grupie osób z neuropatią bez neuroosteopatii (N) było 44 pacjentów, a w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii i bez neuroosteopatii (D) były 33 osoby.

Wiek w grupie chorych wahał się od 23 do 78 lat (średnio 58,5 (\pm 11,0), mediana 58). Średni wiek chorych różnił się istotnie pomiędzy grupami – chorzy z neuroosteopatią byli istotnie młodsi w porównaniu z pozostałymi grupami chorych (CN vs D $p=0,017$; CN vs N $p=0,002$).

Średni wiek grupy kontrolnej nie różnił się istotnie od średniego wieku w całej grupie chorych. Analiza regresji logistycznej wskazuje że **ryzyko rozwoju neuroosteopatii Charcota maleje wraz z wiekiem** i u osób 50-letnich jest około trzykrotnie wyższe niż u osób 60-letnich.

Średni czas trwania cukrzycy w badanych grupach różnił się istotnie pomiędzy grupą chorych z neuropatią (N) a pacjentami z cukrzycą bez neuropatii (D). Średni czas trwania cukrzycy był dłuższy w grupie chorych neuropatią (N) i wynosił 17,1 (\pm 8,2) lat ($p<0,05$), a w grupie chorych z cukrzycą (D) 10,8 (\pm 4,2) lata. Nie było istotnej różnicy pomiędzy czasem trwania cukrzycy w grupie chorych z neuropatią (N) a chorymi z neuroosteopatią Charcota (CN). Wyniki analizy regresji logistycznej wskazały że **istnieje związek czasu trwania cukrzycy z ryzykiem powstania neuroosteopatii** jednak nie jest on silny.

Średni wskaźnik masy ciała (BMI) był zbliżony we wszystkich trzech badanych grupach chorych – nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami.

W grupie chorych z neuroosteopatią Charcota(CN) częściej występowały inne powikłania cukrzycy takie jak retinopatia i nefropatia w porównaniu z pozostałymi grupami chorych.

Analiza poziomu parametrów laboratoryjnych w grupach chorych wykazała, że poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota(CN) był znamienne wyższy niż w grupie chorych bez neuro-

patii (D) ($p=0,0001$). Występowała też istotna różnica w stężeniu HbA1c pomiędzy pacjentami bez neuropatii (D) w porównaniu tymi, u których stwierdzono neuropatię (N) ($p=0,0143$). Średni poziom HbA1c w grupie pacjentów z neuropatią (N) był wyższy. Tak więc **pacjenci z neuropatią (N) jak i neuroosteopatią Charcota (CN) cechowali się gorszym wyrównaniem cukrzycy w porównaniu z pacjentami bez cech neuropatii (D)**.

Obserwowano również istotną różnicę w **poziomie CRP** pomiędzy badanymi grupami chorych – był on **najwyższy w grupie pacjentów z neuroosteopatią Charcota (CN)** (CN vs N $p=0,0002$; CN vs D $p=0,0003$). Poziom ten jednak mieścił się w zakresie wartości prawidłowych.

6.2. Stężenie cytokin OPG i RANKL w osoczu oraz stosunek stężenia OPG/RANKL w badanych grupach chorych

Poziom osteoprotegeryny (OPG) był **najwyższy w grupie osób z neuroosteopatią (CN)** i wynosił średnio $6,6\pm 3,0$ pmol/l. Znamienne różnice w stężeniu tej cytokiny występowały tylko pomiędzy grupą CN a grupą chorych bez neuropatii (D), w której średnie stężenie OPG wynosiło $4,8\pm 2,4$ pmol/l ($p=0,011$) oraz grupą chorych z neuropatią (N) – stężenie OPG $6,3\pm 1,7$ pmol/l, a grupą pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) ($p=0,04$).

Znamienne wyższe stężenie RANKL obserwowano **w grupie pacjentów z neuropatią (N)** w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami chorych (CN) i (D) (CN vs N $p<0,0001$; CN vs D $p=0,017$; N vs D $p=0,002$).

W obrębie grup występują istotne statystycznie różnice stosunku **OPG/RANKL** (wartość statystyki testowej Kruskala-Wallis H ($p=0,0001$)). Wielokrotne porównania pokazały, że **mediana stosunku OPG/RANKL w grupie neuroosteopatii (CN) jest istotnie większa** od mediany stosunku OPG/RANKL w grupie neuropatii (N) oraz mediana stosunku OPG/RANKL w grupie z neuropatią (N) jest istotnie mniejsza od mediany stosunku OPG/RANKL w grupie z cukrzycą bez neuropatii (D).

6.3. Ocena badanych polimorfizmów genów *OPG* (245T>G, 950T>C, 1181G>C, C1217T, 6890A>C, *RANKL* (290C>T, 643C>T, 693G>C) i *RANK* (421C>T, 575C>T)

Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *OPG* (245T>G, 950T>C, 1181G>C, C1217T, 6890A>C) wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami.

Dla polimorfizmu **245T>G** wykazano różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą chorych z neuroosteoartropatią (CN) a grupą chorych z neuropatią (N) oraz pomiędzy grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C). **Analiza regresji wykazała związek tego polimorfizmu z rozwojem neuroosteoartropatii Charcota.**

Stwierdzono również różnice w rozkładzie genotypów **polimorfizmu 950 T>C** pomiędzy grupami z neuroosteoartropatią (CN) i grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C).

W badaniu polimorfizmu **1181 G>C** stwierdzono istotną różnicę w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą neuroosteoartropatii (CN) a kontrolną (C).

W przypadku polimorfizmu **1217C>T** istotną różnicę w rozkładzie genotypów obserwowano pomiędzy grupami z neuropatią (N) a kontrolną (C).

Wykazano, że są istotne różnice w częstości występowania genotypów polimorfizmu **6890A>C** pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią Charcota (CN) a grupą chorych bez neuropatii (D) oraz pomiędzy grupą (D) a grupą kontrolną (C).

Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *RANKL* (290C>T, 643C>T, 693G>C) wykazała także istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami.

Wykazano istotną różnicę w częstości występowania genotypów polimorfizmu **643C>T** pomiędzy grupami z neuroosteoartropatią Charcota (CN) i grupą z neuropatią (N) a grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a także pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C).

Istotna różnica w rozkładzie genotypów polimorfizmu **693G>C** występowała pomiędzy grupą bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C).

Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **290C>T** pomiędzy badanymi grupami.

Analiza częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *RANK* (421C>T,575C>T).

Dla polimorfizmu 421C>T stwierdzono różnicę rozkładu genotypów pomiędzy grupą z neuroosteartropatią (CN) a grupą bez neuropatii (D) .

W przypadku polimorfizmu 575C>T obserwowano różnicę w częstości występowania genotypów pomiędzy grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C).

6.4. Analiza nierównowagi sprzężeń w badanych genach *OPG*,*RANKL* i *RANK*

W przypadku genu osteoprotegeryny (*OPG*) uwidoczniło się silną kosegregację dwóch wariantów genowych: 950T>C i 1181G>C oraz 245T>G i 1217C>T, u osób z neuroosteartropatią (CN). Relacja ta w grupie kontrolnej (C) jest zdecydowanie słabsza

W genie *RANKL* nie uwidoczniło się żadnych różnic w nierównowadze sprzężeń badanych polimorfizmów pomiędzy analizowanymi grupami.

W genie *RANK* najsilniejszą relację pomiędzy dwoma badanymi polimorfizmami obserwowano w grupie kontrolnej (C). Nierównowagi sprzężeń nie stwierdzano w grupie chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN), a w grupie pacjentów z neuropatią (N) kosegregacja była słaba.

6.5. Poziomy cytokin *OPG*, *RANKL* i *RANK* a polimorfizmy genów *OPG*, *RANKL* i *RANK*

W całej badanej grupie chorych obserwowano **istotnie wyższy poziom osteoprotegeryny (OPG)** u osób z genotypem T/G polimorfizmu 245T>G ($p=0,005$), genotypem C/T polimorfizmu 1217C>T ($p=0,045$) genu *OPG* oraz genotypem C/T polimorfizmu 421C>T ($p=0,047$) genu *RANK*.

Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu osteoprotegeryny w osoczu dla żadnego z poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *RANKL*.

W całej badanej grupie chorych stwierdzono **istotnie wyższy poziom RANKL** jedynie u osób z genotypem T/G polimorfizmu 245T>G genu *OPG*.

Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu RANKL w osoczu dla żadnego z poszczególnych genotypów polimorfizmów genów *RANKL* i *RANK*.

Analiza wariacji w **poszczególnych grupach** pacjentów **wykazała istnienie zależności** pomiędzy występowaniem polimorfizmu 245 T>G genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie neuropatii (N) ($p=0,015$), polimorfizmem 950T>C genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie osób z neuroosteopatią (CN) ($p=0,033$), polimorfizmem 1217C>T genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie pacjentów z neuropatią (N) ($p=0,0448$) oraz polimorfizmem 421 C>T genu *RANK* a poziomem RANKL również w grupie chorych neuropatią (N) ($p=0,042$).

6.6. Analiza regresji logistycznej

Analizowano grupę chorych na cukrzycę z neuropatią (N) oceniając wpływ badanych czynników na rozwój neuroosteopatii (CN), grupę chorych z cukrzycą bez neuropatii (D) oceniając związek analizowanych parametrów z rozwojem neuropatii (N) oraz grupę pacjentów z neuroosteopatią Charcota (CN): N vs CN, D vs N,D vs CN). Uwzględniono następujące parametry: płeć, wiek, BMI, czas trwania i typ cukrzycy poziom HbA1c, występowanie retinopatii oraz nefropatii, poziom CRP, poziom OPG, RANKL w surowicy oraz wszystkie analizowane polimorfizmy genu *OPG*, genu *RANKL* oraz genu *RANK*.

Analiza w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) i neuropatią (N).

Wykazano statystycznie istotny, niezależny związek wieku chorych, czasu trwania cukrzycy, występowania retinopatii, genotypu TT polimorfizmu 245T>G genu *OPG* z rozwojem neuroosteopatii Charcota.

Analiza w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) i w grupie chorych z cukrzycą bez neuropatii (D).

Wykazano statystycznie istotny, niezależny związek poziomu HbA1c oraz występowania retinopatii z rozwojem neuroosteopatii Charcota.

Analiza w grupach chorych z neuropatią (N) oraz cukrzycą bez neuropatii (D).

Wykazano statystycznie istotny, niezależny związek występowania retinopatii oraz wyższych poziomów OPG z rozwojem neuropatii.

7. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Jak wskazują dane International Diabetes Federation uzyskane ze 110 krajów, na cukrzycę choruje obecnie na świecie ponad 360 milionów ludzi [1]. W Polsce liczba chorych przekracza 2 miliony. Dzięki postępom w diagnostyce i leczeniu, rzadziej niż przed laty dochodzi do ostrych powikłań tej choroby. Wydłużenie czasu życia pacjentów – przy nadal niedoskonałych możliwościach terapeutycznych – skutkuje rozwojem powikłań przewlekłych zarówno z grupy mikroangiopatii jak i makroangiopatii. Zespół stopy cukrzycowej (ZSC) należy do najcięższych powikłań cukrzycy, którego skutkiem – jeśli nie zostanie wdrożone odpowiednie leczenie – jest odjęcie kończyny. Pojęcie to obejmuje wszelkie zmiany dotyczące tkanek stopy będące następstwem cukrzycy. ZSC dotyczy jednej czwartej chorych na cukrzycę a prawdopodobieństwo amputacji u tych pacjentów, jest piętnastokrotnie wyższe niż u osób bez cukrzycy [342]. Prognoza co do przeżycia po amputacji kończyny bardzo zła. Śmiertelność w ciągu 5 lat po zabiegu amputacji jest większa, niż w przypadku raka piersi lub prostaty [343, 344]. Owrzodzenia rozwijające się na podłożu neuropatii (zespół stopy cukrzycowej neuropatycznej) lub neuropatii i niedokrwienia (zespół stopy cukrzycowej neuropatyczno-niedokrwiennej) stanowią najczęściej spotykaną patologię.

Do obrazu klinicznego zespołu stopy cukrzycowej należy również neuroosteopatia Charcota (CN). Jest to schorzenie obejmujące kości, stawy oraz tkanki miękkie stopy i stawu skokowego. W swojej wczesnej fazie charakteryzuje się procesem zapalnym. CN rozwija się na podłożu obwodowej neuropatii, której najczęstszą przyczyną jest współcześnie cukrzyca [116]. Na skutek współdziałania wielu czynników – neuropatii czuciowo-ruchowej i autonomicznej, urazu, zaburzeń metabolicznych oraz uruchomienia procesu zapalnego, dochodzi do destrukcji układu kostnego, subluksacji, dyslokacji i zniekształcenia stopy.

Deformacja sprzyja urazom i postawianiu owrzodzeń, a niekiedy może być tak zaawansowana, że kończyna traci swoją funkcję podporową. W obu przypadkach istotnie wzrasta ryzyko amputacji.

Zgodnie z wynikami badań epidemiologicznych neuroosteopatia Charcota dotyczy od 0,1% do nawet 29% chorych leczonych w specjalistycznych ośrodkach [110,123,125]. Ze względu na niecharakterystyczny obraz kliniczny, wiele przypadków pozostaje nierozpoznanych i liczba chorych z tym powikła-

niem może być w rzeczywistości większa. Neuroosteoartropatia zwykle występuje jednostronnie, ale nawet u ok. 30% pacjentów może objąć również drugą kończynę [119]. U wszystkich tych pacjentów stwierdza się cechy zaawansowanej neuropatii.

W fazie ostrej, obserwuje się cechy miejscowego stanu zapalnego pod postacią obrzęku, zaczerwienienia, wzrostu ucieplenia zajętej stopy, czego skutkiem jest błędna diagnoza. W związku z niecharakterystycznym obrazem klinicznym w wielu przypadkach rozpoznanie postawione jest zbyt późno co skutkuje brakiem odpowiedniego postępowania i w konsekwencji amputacją kończyny. Jak wskazują obserwacje właściwa diagnoza może być opóźniona średnio nawet o blisko 30 tygodni [120]. Wczesne rozpoznanie natomiast wiąże się z istotnie rzadszym powstawaniem deformacji. W stadium zaawansowanym stwierdza się nasilone zmiany kostne i stawowe – przemieszczenie, rozkawałkowanie, a następnie fuzje i sklerotyzację fragmentów kostnych. Klinicznie obserwuje się postępujące zniekształcenie stopy. Ryzyko powstania niegojącego się owrzodzenia oraz amputacji kończyny jest u takich chorych bardzo wysokie.

Pomimo, że pierwsze opisy neuroosteoartropatii pochodzą sprzed kilku wieków do dzisiaj nie udało się w pełni wyjaśnić patogenezy tego dramatycznego w swoim przebiegu powikłania.

Wielu badaczy wskazuje na rolę niekontrolowanego procesu zapalnego w etiopatogenezie neuroosteoartropatii. Autorzy obserwowali w tej grupie chorych wzrost aktywności osteoklastów, nasiloną ekspresję cytokin prozapalnych w osteoklastach, a także w monocytach jak również oporność monocytów na apoptozę [184, 345, 346]. Proces zapalny jednak w pełni nie wyjaśnia mechanizmów doprowadzających do rozwoju neuroosteoartropatii.

Analiza gęstości mineralnej kości u chorych na cukrzycę wskazuje na istnienie umiarkowanej osteopenii u tych pacjentów, zwłaszcza u osób z cukrzycą typu 1. Znacznie bardziej wyrażone obniżenie gęstości mineralnej kości obserwuje się u chorych, u których w przebiegu cukrzycy doszło do rozwoju neuropatii [152, 176]. Związek cukrzycy i neuropatii z osteoporozą jak również stwierdzana w neuroosteoartropatii Charcota osteopenia, stały się podstawą do poszukiwania dodatkowych czynników przyczyniających się do powstawania tego powikłania.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, dotyczące potencjalnego wpływu czynników genetycznych na rozwój schorzeń układu kostnego – przede wszystkim takich jak osteoporoza czy choroba Pageta [295, 296, 297]. Czynniki

genetyczne mogą być odpowiedzialne za międzyosobniczą zmienność w gęstości mineralnej tkanki kostnej (BMD – *bone mineral density*) oraz jej wytrzymałości. Prowadzone dotychczas badania dotyczyły głównie osteoporozy ze względu na bardzo duże współcześnie rozpowszechnienie tej choroby. Brano pod uwagę geny kodujące hormony, odpowiedzialne za gospodarkę wapniową oraz ich receptory, białka macierzy kostnej jak również czynniki wzrostowe oraz cytokiny związane ze strukturą i funkcją kości.

Badane wcześniej polimorfizmy genów kodujących niektóre cytokiny i kandydujących do miana markerów osteoporozy (m.in. IL-6, TGF β 1, czy też antagoniści receptora IL-1) wykazywały tylko niewielki związek z gęstością mineralną (BMD) oraz ryzykiem złamań kości.

Od niedawna wiadomo, że zasadniczą rolę w remodelingu kostnym odgrywa układ cytokin OPG/ RANKL /RANK. Osteoklastogeneza jest regulowana przez RANKL i RANK, a proces ten jest nadzorowany i hamowany przez osteoprotegerynę (OPG). Polimorfizm genów kodujących układ tych cytokin może odgrywać rolę w genetycznej regulacji masy kostnej.

Pierwsze prace dotyczące występowania polimorfizmu w obrębie genów tych cytokin, a konkretnie genu osteoprotegeryny (OPG), pojawiły się niedawno. W roku 2002 Langhdał i wsp. [296] przebadali cały gen osteoprotegeryny pod kątem występowania polimorfizmów oraz ich ewentualnego związku z ryzykiem złamań kości, w grupie ponad trzystu kobiet i mężczyzn, z rozpoznaną osteoporozą. W analizowanej populacji znaleziono dwanaście polimorfizmów tego genu. Pięć z nich (149T>C, 163A>G, 209G>A, 245T>G, 950T>C) zlokalizowanych jest w rejonie promotora. Lokalizacja ta może powodować zmianę w efektywności transkrypcji danego genu, a co za tym idzie w ilości syntetyzowanego białka. W pierwszym eksonie znaleziono polimorfizm 1181G>C powodujący zamianę lizyny na asparaginę. Kolejny polimorfizm 1217C>T zlokalizowany jest w intronie pierwszym. Polimorfizmy 445C>T oraz 4441C>T znajdują się w drugim intronie, 6833A>G w eksonie 4 oraz polimorfizm 6890A>C w intronie 4. Autorzy opisali również jeden polimorfizm związany z delecją dwóch par zasad 4690delCT.

Polimorfizmy 149T>C, 209G>A, 245T>G, 1217C>T oraz 4441C>T znajdowały się w całkowitym sprzężeniu, podobnie jak 445C>T, 4680delCT, 6833A>G i 6890A>C. Następnie w populacji prawie 300 chorych z osteoporozą oraz u ponad 300 zdrowych ochotników, analizowano wpływ pięciu polimorfizmów 163A>G, 245T>G, 950T>C, 1181G>C i 6890A>C na masę kostną i wy-

stępowanie złamań [296]. Dwa spośród nich, 163A>G oraz 245T>G, wiązały się w badanej populacji ze zwiększonym ryzykiem złamań kości. W przypadku polimorfizmu 163A>G, allel G pojawiał się częściej u chorych ze złamaniami trzonów kręgow a genotyp CC polimorfizmu 1181C>G wiązał się z kolei z mniejszym ryzykiem złamania. Nie obserwowano różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmów 950T>C i 6890A>C pomiędzy badanymi grupami. Natomiast żaden z opisanych polimorfizmów nie wykazywał związku z gęstością mineralną kości [296].

W niewielkim badaniu na populacji belgijskiej Wuyts i wsp. [295] opisali związek pomiędzy polimorfizmem 505C>T w intronie 2 genu OPG i chorobą Pageta. Podobnie Daroszewska i wsp. [347] badając znacznie większą grupę chorych, stwierdzili występowanie związku pomiędzy polimorfizmem 1181G>C genu osteoprotegeryny w eksonie 1 a tym schorzeniem. Polimorfizm 118G>C skutkuje zmianą aminokwasu w peptydzie sygnałowym OPG, co może powodować zaburzenia sekrecji tej cytokiny.

Polimorfizm genów *RANKL* i *RANK* badano w grupie ponad 500 chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) [348] i wykazano związek pomiędzy polimorfizmem genów *RANK* (421C>T) i *RANKL* (rs2277438) a podatnością na zachorowanie na RZS. Najwięcej dotychczas opublikowanych badań dotyczy jednak związku polimorfizmów genów triady OPG/RANKL/RANK z występowaniem osteoporozy.

Vidal w swojej analizie [349] obserwował istotną statystycznie różnicę w częstości występowania genotypów polimorfizmu 950T>C genu osteoprotegeryny pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną na którą składały się kobiety po menopauzie, zamieszkujące Maltę, u których stwierdzano zmniejszenie masy kostnej. Występowanie genotypu TT polimorfizmu 950T>C genu osteoprotegeryny w tej populacji wiązało się częściej z niższą wartością wskaźnika gęstości mineralnej kości.

Moffett i wsp. [350] badali związek pomiędzy polimorfizmem 1181G>C a gęstością mineralną kości i ryzykiem złamań w grupie ponad sześciu tysięcy starszych kobiet. Występowanie allelu G w tej grupie wiązało się z mniejszą BMD a u kobiet z genotypem GG ryzyko złamań kości było większe w porównaniu z kobietami z genotypem CC.

W roku 2010 Roshandel i wsp. [298] w dużym badaniu EMAS (European Male Ageing Study) obejmującym ponad 2600 mężczyzn, opisali związek zmienności genetycznej w układzie cytokin OPG/RANKL/RANK z gęstością

mineralną kości [290]. Autorzy stwierdzili korelację polimorfizmu 1181G>C (rs2073618) genu osteoprotegeryny oraz polimorfizmu rs9594759 zlokalizowanego 110 par zasad przed genem *RANKL*, z wartością wskaźnika gęstości mineralnej kości. Wykazali również istnienie związku licznych polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* z poziomami markerów obrotu kostnego mierzonymi w surowicy krwi.

Publikacje dotyczące powiązania polimorfizmów genu *OPG* z osteoporozą można znaleźć również w literaturze polskiej. W pracy Seremak-Mrozikiewicz i wsp.[297] obejmującej pacjentki z osteoporozą, osteopenią oraz osoby zdrowe autorzy przebadali grupę ponad 300 kobiet i zaobserwowali częstsze występowanie heterozygot AG polimorfizmu 163A>G genu osteoprotegeryny w grupie chorych z osteoporozą.

Dong i wsp. [301] w grupie ponad 1800 pacjentów rasy kaukaskiej pochodzących z 405 rodzin, badali związek czynników genetycznych – polimorfizmu genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* ze zmiennością wskaźnika wytrzymałości szyjki kości udowej- fCSI (*femoral neck compression strength index*). Parametr ten służy szacunkowej ocenie ryzyka złamania proksymalnego odcinka tej kości. Przebadano 37 polimorfizmów, spośród których trzy: *RANKL* – rs12585014, rs7988338 i rs2148073 wykazały istotny związek ze wskaźnikiem wytrzymałości szyjki kości udowej. Dwa ze stwierdzonych polimorfizmów (rs12585014, rs7988338) znajdowały się w rejonie promotora i mogą skutkować zmianą wydajności transkrypcji a trzeci (rs2148073) w intronie 2. Wszystkie trzy polimorfizmy znajdowały się całkowitej nierównowadze sprzężeń. Nie znaleziono natomiast związku pomiędzy polimorfizmem genów *OPG* i *RANK* z fCSI, ani innymi parametrami fenotypowymi takimi jak gęstość mineralna kości, szerokość szyjki kości udowej czy masa ciała [301].

Również niektóre inne badania, nie potwierdzają związku osteoporozy z polimorfizmem genu *OPG*. Brandstrom [299] nie stwierdził wpływu wariantów genetycznych 950T>C i 1217C>T genu osteoprotegeryny na BMD, w populacji starszych kobiet w Szwecji. Podobnie Ueland i wsp.[351] badając polimorfizmy genu *OPG*- 1181G>C, 950T>C i 163A>G nie obserwowali korelacji, pomiędzy występowaniem tych polimorfizmów a gęstością mineralną kości i częstością złamań.

Kim i wsp.[352] analizowali polimorfizmy 163A>G, 209G>A, 245T>G, i 1181G>C genu osteoprotegeryny, polimorfizmy 421C>T i 575C>T genu *RANK* oraz polimorfizmy rs12721445 i rs2277438 genu *RANKL*. Autorzy ci obserwo-

wali związek polimorfizmu 1181G>C genu osteoprotegeryny, zarówno izolowanego, jak i występującego wspólnie z polimorfizmem rs2277438 genu *RANKL* a gęstością mineralną kości mierzoną w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Wskaźnik BMD był istotnie wyższy u uczestniczek badania z genotypem CC, w porównaniu z kobietami, u których występował genotyp GC lub GG. Sam polimorfizm rs2277438 genu *RANKL* nie wykazywał związku z BMD.

Mencej i wsp. opisali z kolei statystycznie istotny związek gęstości mineralnej kości z polimorfizmami 290C>T, 643C>T, 693G>C genu *RANKL*, zlokalizowanymi w rejonie promotora [353].

Rozbieżności w wynikach cytowanych badań mogą mieć związek z faktem, że prowadzone one były w zróżnicowanych populacjach, a liczba osób uczestniczących w badaniach była ograniczona. Ponadto, w pracach odnoszono się do różnych lokalizacji w szkielecie (kręgosłup, szyjka kości udowej i in.) . Być może niektóre allele mają związek z gęstością masy kostnej całego szkieletu, inne zaś mogą wpływać tylko na określone struktury.

Opublikowane niedawno asocjacyjne badania całego genomu człowieka wydają się potwierdzać rolę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP – *single-nucleotide polymorphism*) w rozwoju osteoporozy. Richards i wsp. [354] opisali związek polimorfizmu rs4355801 zlokalizowanego na chromosomie 8, w sąsiedztwie genu osteoprotegeryny z osteoporozą. Polimorfizm ten miał związek nie tylko z gęstością mineralną kości, ale także z poziomem ekspresji osteoprotegeryny w linii komórek limfoblastycznych.

W metaanalizie przeprowadzonej przez tego samego autora i wsp. z wielu krajów [355] nie potwierdzono korelacji z osteoporozą w przypadku większości opisanych polimorfizmów genów wcześniej uznanych za mające związek z tą chorobą. Związek z osteoporozą (z BMD) wykazano tylko w przypadku wariantów 9 genów, wśród których znajdowały się polimorfizmy genów *OPG*, *RANKL* i *RANK*. Dodatkowo polimorfizm genu *RANK* miał wpływ na ryzyko złamań kości.

Ścieżka sygnałowa *OPG/RANKL/RANK* odgrywa zasadniczą rolę mechanizmie utraty masy kostnej w różnych schorzeniach. Ostatnio wykazano obecność zależnego do *RANKL* procesu resorpcji kostnej przez osteoklasty w przebiegu cukrzycy [263]. W obecności *RANKL* aktywność osteoklastyczna u chorych z neuroosteopatią istotnie wzrastała.

Dotychczas nie udało się ustalić dłaczego proces destrukcji kostnej obserwowany u pacjentów z neuroosteopatią Charcota, dotyczy tylko niektórych

chorych obciążonych neuropatią. Pomimo pojawiających się coraz liczniej doniesień o roli polimorfizmów genów kodujących cytokiny OPG, RANKL i RANK w schorzeniach układu kostnego, charakteryzujących się zmniejszeniem masy kostnej a zwłaszcza w osteoporozie, do tej pory pojawiły się tylko dwie prace, w których analizowano związek polimorfizmów w obrębie genów tego układu cytokin z występowaniem neuroosteartropatii Charcota. [294, 309]. Obie prace dotyczyły polimorfizmów genu osteoprotegeryny.

W pierwszej z nich, z roku 2009, Pitocco i wsp. [294] opublikowali wyniki analizy związku, pomiędzy polimorfizmem 1181G>C i 245T>G genu *OPG* a neuroosteartropatią w populacji Półwyspu Apenińskiego. Badana grupa obejmowała chorych na cukrzycę z neuroosteartropatią, pacjentów z cukrzycą bez neuroosteartropatii oraz grupę kontrolną osób zdrowych. Autorzy opisali silną korelację alleli G obu polimorfizmów z występowaniem neuroosteartropatii.

W zbliżonych analizach w populacji polskiej, w badaniach własnych, zostały z uwzględnione dwa warianty genetyczne opisane przez grupę Pitocco oraz z poszerzono pulę badanych polimorfizmów *OPG* o kolejne trzy: 6890A>C, 1217C>T oraz 950T>C.

We pracy tej [309] znaleziono istotną różnicę pomiędzy grupą chorych na cukrzycę z neuroosteartropatią oraz grupą pacjentów z neuropatią bez neuroosteartropatii w przypadku występowania polimorfizmów 1217C>T i 245T>G. Genotyp TT w pozycji 1217 oraz 245 wiązał się z trzykrotnym wzrostem ryzyka rozwoju neuroosteartropatii (odpowiednio OR = 3,19 [95% CI 1,05–9,63], p = 0,04 i OR = 3,61 [95% CI 1,21–10,775], p = 0,021). W populacji polskiej analizowanej w tej pracy [309] nie potwierdzono związku polimorfizmu 1181G>C ani pozostałych badanych polimorfizmów z występowaniem neuroosteartropatii.

W związku z tak licznymi doniesieniami na temat powiązania osteoporozy z polimorfizmem genowym triady OPG/RANKL /RANK oraz tylko pojedynczymi publikacjami, dotyczącymi potencjalnej roli ww. polimorfizmów w patogenezie neuroosteartropatii Charcota, podjęto próbę dokładniejszej analizy tego problemu.

7.1. Omówienie i dyskusja dotycząca charakterystyki grupy badanej

Badania dotyczyły 139 pacjentów z cukrzycą, w tym 62 z neuroosteopatią Charcota (CN), 44 z neuropatią bez neuroosteopatii (N) oraz 33 z cukrzycą bez neuropatii (D).

Pacjenci z neuroosteopatią Charcota badani w niniejszej pracy stanowili około 1,6% wszystkich pacjentów będących pod opieką Regionalnego Centrum Diabetologii w Gdańsku (RCD) Kliniki Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii. Biorąc pod uwagę fakt, że w ramach tej placówki działa specjalistyczny gabinet stopy cukrzycowej do którego kierowana jest większość pacjentów z podejrzeniem CN, odsetek ten odpowiada danym epidemiologicznym przytaczanym w literaturze [110,123].

W analizowanej w niniejszej pracy grupie pacjentów z neuroosteopatią (CN) kobiety stanowiły mniejszość (30,6%). Dotychczas nie obserwowano korelacji występowania CN z płcią. Choruje podobna liczba mężczyzn i kobiet [117].

Natomiast w porównaniu z pozostałymi dwiema badanymi grupami (N i D), w grupie osób z CN proporcjonalnie najwięcej było chorych na cukrzycę typu 1 (22,6%) podczas gdy w grupie N – 11,4%, a w grupie D – 15,2%.

W analizowanym piśmiennictwie autorzy podają różne dane ilościowe dotyczące osób z cukrzycą typu 1 i 2 wśród chorych z neuroosteopatią Charcota. W populacji ocenianej przez Armstronga dominował typ 2 [135], natomiast w publikacjach Fabrina i Jirkowskiej więcej było chorych z typem 1 cukrzycy [119, 142]. Również Gazis [122] podaje większy odsetek chorych z cukrzycą typu 1 w badanej przez siebie populacji osób z CN.

Średni wiek w całej badanej grupie chorych w niniejszej pracy wynosił 58,5 ($\pm 11,0$) lat, natomiast średni wiek chorych w grupie z neuroosteopatią (CN) był nieco niższy – 55,3 ($\pm 10,6$) lat. Jak podaje większość autorów, najwyższa zapadalność na neuroosteopatię dotyczy właśnie pacjentów pomiędzy 5 a 6 dekadą życia. Powyżej sześćdziesiątego roku życia, ryzyko rozwinięcia tego powikłania maleje [119,128,135,142]. Może to mieć związek z rzadziej występującym u młodszych pacjentów miażdżycowym zwężeniem naczyń. W CN w prawie wszystkich przypadkach zachowane jest dobre ukrwienie kończyny a tętno na tętnicy grzbietowej stopy jest z reguły bardzo dobrze wyczuwalne. Ostatnio publikowane dane wskazują jednak, że w przypadku cukrzycy typu 1, rozwijać neuroosteopatię mogą również pacjenci jeszcze młodszy – średnio pomiędzy 4 a 5 dekadą życia [182].

Wiek pacjentów w badanej populacji chorych z CN ($55,3 \pm 10,6$ lat) różnił się znamienne od wieku chorych w pozostałych dwóch grupach, byli oni młodsi od osób w grupie N i D (wiek odpowiednio $62 \pm 7,7$ lat i $59,9 \pm 13,9$ lat). Wiek chorych, jak wykazała analiza regresji logistycznej w niniejszej pracy dla grupy z neuroosteopatią (CN) i samą neuropatią (N), należy do czynników, które mają związek z rozwojem neuroosteopatii: u chorych 50-letnich szansa na rozwój tego powikłania jest trzykrotnie większa niż u pacjentów po 60 roku życia.

Średni czas trwania cukrzycy u chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) w analizowanej grupie pacjentów wynosił $14,6 (\pm 8,4)$ lat. U większości chorych rozpoznawano cukrzycę typu 2 (77,5%) w przypadku której czas rozpoznania choroby nie zawsze odpowiada rzeczywistemu rozpoczęciu zaburzeń metabolicznych. Tak więc faktyczny czas trwania cukrzycy w tej grupie mógł być w istocie dłuższy. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że u większości pacjentów z neuroosteopatią Charcota cukrzyca trwa co najmniej 10 lat [128]. Petrova i wsp. w swojej publikacji [182] wskazują z kolei, że u chorych z cukrzycą typu 1 i CN, czas trwania cukrzycy może być zdecydowanie dłuższy i wynosi 20 do 24 lat. Analiza regresji logistycznej dla osób z neuroosteopatią (CN) i neuropatią (N) w populacji badanej w niniejszej pracy wskazuje na związek czasu trwania cukrzycy z rozwojem neuroosteopatii.

Wyrównanie cukrzycy jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju powikłań cukrzycy, szczególnie mikroangiopatii [53,356].

Stężenie hemoglobiny glikowanej było najwyższe w grupie pacjentów z neuroosteopatią Charcota (8,7%) co wskazuje na gorsze niż w pozostałych grupach wyrównanie cukrzycy, pomimo faktu że prawie wszyscy pacjenci (60 osób) było leczonych insuliną. Warto również podkreślić, że kontrola glikemii w grupach z neuropatią (CN i N), istotnie różniła się od wyrównania glikemii w grupie osób tylko z cukrzycą (D), u których nie doszło do rozwoju neuropatii (wartość HbA1c w grupie N wynosiła 8,1%, w grupie D – 7,1%). Gorsze wyrównanie glikemii w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (a także u chorych z neuropatią bez neuroosteopatii) potwierdzają inni autorzy [182,185,294].

Czynniki biomechaniczne, jak wskazują obserwacje [129], mogą odgrywać rolę w powstawaniu, a także mieć wpływ na przebieg neuroosteopatii Charcota. W jednej z publikowanych prac [130] w grupie ponad 600 chorych z neuroosteopatią obserwowano, że nadwaga jest niezależnym czynnikiem ryzy-

ka rozwoju tego powikłania. Inni autorzy [357] wiążą większe obciążenie (wyrażone w kg/tydzień) jedynie z nasileniem ostatecznej deformacji zajętej stopy. Wskaźnik masy ciała (BMI) w badanej populacji chorych z neuroosteoartropatią (CN) był wyższy od prawidłowego i wynosił $30,6 \pm 5,0 \text{ kg/m}^2$, ale nie różnił się istotnie od BMI w pozostałych badanych grupach (N, D). Podobne wartości BMI dla chorych z CN uzyskała Petrova [182] w analizie przypadków ostrej CN. W innych pracach opisywane wartości BMI w tej grupie chorych też z reguły są wyższe od prawidłowych i wskazują na nadwagę lub otyłość [131]. Ponownie należy jednak podkreślić stosunkowo wyższy w grupie CN, niż w pozostałych badanych grupach, odsetek pacjentów z cukrzycą typu 1, u których wskaźnik masy ciała jest z reguły niższy, i w przypadku których mówi się raczej o teorii neurowaskularnej w patogenezie neuroosteoartropatii. U chorych z cukrzycą typu 2 (którzy często mają nadwagę) rozważa się natomiast teorię neurotraumatyczną. W opublikowanej ostatnio pracy, której autorzy poszukiwali związku wskaźnika masy ciała z neuroosteoartropatią [358] nie potwierdzono roli otyłości w rozwoju CN podobnie jak w obecnych badaniach. Być może nadwaga przyczynia się głównie do rozwoju deformacji w przebiegu tego powikłania. [131] nie stanowi natomiast czynnika ryzyka jego powstawania.

Inne powikłania cukrzycy, zwłaszcza z grupy mikroangiopatii często towarzyszą chorym z neuroosteoartropatią Charcota. Jak wskazują wyniki publikowanych badań, u chorych z retinopatią i nefropatią częściej obserwuje się neuroosteoartropatię [122,359,360]. W badanej w obecnej pracy populacji retinopatię stwierdzono u 51 (82,3%) pacjentów w grupie CN, podczas gdy w pozostałych dwóch grupach liczba ta wynosiła: 24 (54,5%) w grupie tylko z neuropatią (N) i 6 (18,1%) w grupie pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D). Jak wykazała analiza regresji badanej populacji, retinopatia ma istotny związek z występowaniem neuroosteoartropatii. U chorych z retinopatią w niniejszej pracy ryzyko wystąpienia neuroosteoartropatii było 4,5 razy wyższe niż u osób bez zmian na dzień. Na rozwój tego powikłania szczególnie narażeni mogą być chorzy, u których w przebiegu cukrzycy i retinopatii doszło do pogorszenia ostrości, lub utraty wzroku. Osoby te mogą częściej doznawać urazów stóp, które bywają czynnikiem wyzwalającym neuroosteoartropatię. Obserwacja ta ma ważne znaczenie kliniczne i wskazuje na konieczność szczególnej edukacji w tej grupie pacjentów, ze wskazaniem na ryzyko związane z większym zagrożeniem urazami oraz ich konsekwencją.

W literaturze znaleźć można również doniesienia o powiązaniu neuroosteopatii z nefropatią [361] a zwłaszcza wysokim ryzyku patologicznych złamań kości stopy i stawu skokowego, u chorych po przeszczepie nerki, niezależnie od stosowanego leczenia immunosupresyjnego. Nefropatię w różnym stadium zaawansowania często obserwuje się u chorych z neuroosteopatią. W grupie analizowanej przez Valabhij i wsp.[362] powikłania ze strony nerek stwierdzano u 30% pacjentów z CN. Przyczyny tej zależności, jak piszą autorzy, są niejednoznaczne. Rolę odgrywać tu może jednocześnie występowanie neuropatii i nefropatii (jako powikłań o charakterze mikroangiopatii) lub też do rozwoju neuroosteopatii Charcota przyczyniać się mogą zaburzenia metabolizmu kostnego związane z samą chorobą nerek.

W badanej w niniejszej pracy grupie pacjentów nefropatia występowała często, rozpoznawano ją u 29 (46,8%) chorych z neuroosteopatią Charcota (w tym u 11 osób w stadium niedomogi nerek) u 6 (13,6%) chorych w grupie neuropatii (N) i tylko u jednego pacjenta w grupie z cukrzycą bez neuropatii (D). Nie obserwowano jednak istotnego związku uszkodzenia nerek z CN.

W swojej ostrej fazie neuroosteopatia Charcota manifestuje się klinicznymi objawami miejscowego stanu zapalnego. Petrova i wsp.[185] oceniali ogólnoustrojowe markery stanu zapalnego u 36 pacjentów z CN. W swojej pracy analizowali między innymi **poziom CRP**, jako uznanego markera ostrej fazy reakcji zapalnej. W badanej populacji obserwowali prawidłowe poziomy lub tylko nieznaczny wzrost stężenia CRP w surowicy krwi. Autorzy wnioskują, że w przypadku neuroosteopatii Charcota brak jest powiązania pomiędzy miejscowymi objawami zapalenia a reakcją ogólnoustrojową. W analizowanej w niniejszej pracy grupie chorych z CN poziom CRP był znamienne wyższy od wartości w grupie z neuropatią (N) i cukrzycą (D), mieścił się jednak w zakresie wartości prawidłowych (zakres wartości normalnych: 0,0-5,0 mg/l). Wyniki te wydają się potwierdzać spostrzeżenie o braku ogólnoustrojowej reakcji zapalnej u pacjentów z neuroosteopatią pomimo miejscowych objawów zapalenia pod postacią wzrostu temperatury na powierzchni zajętej stopy.

7.2. Omówienie i dyskusja dotycząca polimorfizmu genów *OPG*, *RANKL* i *RANK*

Ze względu na różnorodność nomenklatury genetycznej stosowanej w piśmiennictwie i różne oznaczenia używane w symbolice polimorfizmów, w niniejszej pracy przy cytowaniu literatury przytaczano oryginalne oznaczenia zawarte w danej publikacji. Przeprowadzone badania własne opisywano wg nomenklatury uwzględniającej zmiany w sekwencji oraz ich pozycję.

Na końcu pracy (w aneksie) dołączono tabelę z ujednoczonym oznaczeniem polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* wraz z ich opisami i położeniem.

Badaniami genetycznymi w niniejszej pracy objęto:

1. pięć polimorfizmów genu osteoprotegeryny: dwa z nich 245T>G(rs3134069) oraz 950T>C (rs2073617) zlokalizowane były w rejonie promotorowym, jeden 1181G>C (rs2073618) w rejonie pierwszego eksonu, a dwa w rejonie intronów- 1217C>T (rs3102734) w intronie pierwszym oraz 6890A>C (rs7844539) w intronie czwartym
2. trzy polimorfizmy genu *RANKL*: wszystkie zlokalizowane w rejonie niekodującym 290C>T (rs9525641) 643C>T (rs9533156) i 693G>C (rs9533155)
3. dwa polimorfizmy genu *RANK* zlokalizowane w eksonach: 421C>T (rs35211496) w eksonie czwartym oraz 575C>T (rs1805034) w eksonie szóstym.

W trzech badanych grupach chorych (CN, N i D) oraz w grupie kontrolnej (C) oceniono częstość występowania poszczególnych genotypów dla wszystkich wymienionych wyżej polimorfizmów.

Polimorfizmy genu *OPG*

Analizując badane grupy pacjentów w aspekcie występowania polimorfizmów genu *OPG*, wykazano dla **polimorfizmu 245T>G** znajdującego się w rejonie promotora, zdecydowaną dominację liczbą homozygot TT w całej objętej badaniem populacji. Występowały one w przewadze we wszystkich grupach chorych jak również w grupie kontrolnej (grupa CN 90,3%, grupa N 75%, grupa D 84,9% i grupa kontrolna 92,6%). Homozygoty GG obserwowano jedynie w grupie chorych na cukrzycę (D), stanowiły one jednak tylko 3% wszystkich genotypów w tej grupie.

Rozkład częstości genotypów tego polimorfizmu różnił się istotnie pomiędzy grupami: chorych z neuroosteoartropatią (CN) oraz pacjentami z neuropatią (N) i grupą pacjentów z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C). Heterozygotyczne genotypy występowały u chorych z neuropatią, nie obserwowano ich natomiast wśród chorych z neuroosteoartropatią, gdzie było więcej homozygot TT. W grupie kontrolnej rozkład genotypów był zbliżony do rozkładu w grupie osób z neuroosteoartropatią. Podobne wyniki uzyskano we wcześniejszych badaniach własnych, co zawarte zostało w opublikowanej pracy [309] gdzie również obserwowano silną korelację pomiędzy genotypem TT a występowaniem neuroosteoartropatii. W obecnie analizowanej grupie chorych, znacząco liczniejszej od prezentowanej w poprzedniej pracy, obecność genotypu TT osteoprotegeryny, wiązała się z około siedmiokrotnie większym ryzykiem rozwoju neuroosteoartropatii w porównaniu z grupą pacjentów u których stwierdzano pozostałe dwa genotypy TG i GG (obecność genotypu TG OR= 0,14 [0,029-0,72], p=0,02). W kontekście powyższych wyników można również rozważać zastosowanie tego polimorfizmu jako markera neuropatii.

W badaniu Pitocco [294] homozygotyczne genotypy TT genu *OPG* dominowały we wszystkich analizowanych grupach, w grupie z neuroosteoartropatią było ich jednak mniej w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami – grupą pacjentów z neuropatią bez neuroosteoartropatii i grupą kontrolną. Homozygot GG nie obserwowano w ogóle w grupie pacjentów z neuropatią. W grupie kontrolnej genotyp GG występował tylko u ok. 2% badanych, natomiast wśród pacjentów z neuroosteoartropatią charakteryzował blisko 12% chorych. W populacji włoskiej analizowanej w badaniu Pitocco obecność allelu T polimorfizmu 245T>G skutkowało mniejszym ryzykiem rozwinięcia objawów chorobowych.

Rolę polimorfizmu 245T>G genu *OPG* w rozwoju osteoporozy u kobiet w okresie pomenopauzalnym opisywali także badacze ze Słowenii [363]. Obserwowali oni niższy wskaźnik masy kostnej mierzony w okolicy kręgosłupa lędźwiowego u kobiet z polimorfizmem 245T>G. Genotyp TT w tej populacji występował u 89,3% badanych a genotyp TG u 10,7% osób.

Również wyniki badań Langhdał i wsp. [296] sugerują możliwy udział polimorfizmu 245T>G genu osteoprotegeryny w patogenezie osteoporozy. W analizowanej przez autorkę populacji allel G występował u 12,3% chorych z osteoporozą a jedynie u 6,5% osób z grupy kontrolnej. U nosicieli tego allelu obserwowano również wyższe ryzyko złamań kości.

Występowanie polimorfizmu 245T>G genu *OPG* w rejonie promotora może mieć wpływ na ekspresję genu oraz skutkować zmianą stężenia tej cytokiny w surowicy.

Kolejny analizowany w obecnej pracy **polimorfizm 950T>C** również znajduje się w rejonie promotora [296]. W badanej populacji, genotyp TT w tej pozycji występował najliczniej w grupach pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) oraz w grupie kontrolnej (C). Genotyp TC dominował w grupie kontrolnej (C), natomiast najwięcej homozygot CC występowało w grupie neuroosteoartropatii (CN) oraz neuropatii (N). Istotne różnice w rozkładzie genotypów obserwowano pomiędzy grupami z neuroosteoartropatią (CN) i neuropatią (N) a grupą kontrolną (C), podobnie jak w we wcześniejszym badaniu własnym [309]. W analizowanej w niniejszej pracy populacji, w odróżnieniu od obserwacji Pitocco i wsp. [294], ponownie nie potwierdzono różnicy w częstości występowania poszczególnych genotypów, pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią (CN) a grupą z neuropatią (N). Dane w literaturze dotyczące roli polimorfizmu 950T>C w powstawaniu zmian kostnych w przebiegu różnych schorzeń nie są w pełni zbieżne.

Brändström i wsp. nie obserwowali związku polimorfizmów 950T>C i 1217C>T z BMD w grupie ponad tysiąca kobiet w wieku około 75 lat [299]. Choć badania wydają się nie potwierdzać roli polimorfizmu 950T>C genu *OPG* w powstawaniu zmian kostnych, sugerowano jego związek z procesem kalcyfikacji naczyń często obserwowanym w przebiegu neuropatii. Z kolei Rhee [308] w populacji koreańskiej nie znalazł związku pomiędzy polimorfizmem 950T>C a kalcyfikacją aorty i występowaniem choroby wieńcowej.

W bieżącym roku opublikowano pracę Biscetti i wsp. [364] opisującą związek polimorfizmów 950T>C (a także 1181G>C i 245T>G) genu *OPG* z występowaniem udaru niedokrwinnego mózgu w grupie ponad 300 chorych na cukrzycę.

W obecnej pracy obserwowano istotną różnicę w rozkładzie genotypów wariantu 950T>C pomiędzy grupą chorych z neuropatią (N) oraz pacjentów z neuroosteoartropatią Charcota (CN) a grupą kontrolną. Na podstawie tych obserwacji można sugerować istnienie związku polimorfizmu 950T>C z rozwojem neuropatii. Allel C może sprzyjać powstaniu tego powikłania (występował on u ponad 80% pacjentów w grupie CN, 77% chorych w grupie N i u 69% osób w

grupie kontrolnej). Jednak w świetle wspomnianego powyżej piśmiennictwa może on być markerem kalcyfikacji naczyń, która często towarzyszy neuropatii.

Polimorfizm 1181G>C genu *OPG* należy do najczęściej badanych i opisywanych w literaturze. Jest on zlokalizowany w pierwszym eksonie i powoduje zmianę aminokwasu lizyny na asparaginę w peptydzie sygnałowym. Z uwagi jednak na cechy budowy tych aminokwasów i fakt że oba należą do grupy aminokwasów polarnych (hydrofilnych) być może zmiana ta pozostaje bez wpływu na właściwości całego peptydu [296]. W badaniach Langhdał [296] polimorfizm ten nie wykazywał silnego związku z BMD w okolicy lędźwiowej kręgosłupa lub proksymalnego odcinka kości udowej. Homozygotyczny genotyp CC pojawiał się jednak istotnie rzadziej u chorych z przebytymi złamaniami w porównaniu z osobami zdrowymi. Autorzy powyższego opracowania wnioskują, że ten wariant genowy prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli w patogenezie osteoporozy. Podobnie nie obserwowano związku polimorfizmu 1181G>C z osteoporozą w populacji australijskiej [351] oraz polskiej [297]. Inni badacze opisują jednak istnienie zależności pomiędzy polimorfizmem 1181G>C a gęstością mineralną kości. W populacji ponad 500 irlandzkich kobiet (380 po menopauzie i 130 w wieku przedmenopauzalnym) Wynne [365] opisał istotny, chociaż niezbyt silny, związek allelu C z niższą BMD w okolicy kręgosłupa lędźwiowego i szyjki kości udowej w grupie kobiet po menopauzie. Podobne wyniki uzyskali Kim [352] w populacji koreańskiej oraz Moffet [350] w populacji amerykańskiej rasy białej.

Metaanaliza opublikowanych dotychczas prac [300] wydaje się wskazywać na związek polimorfizmu 1181G>C genu osteoprotegeryny z wartością wskaźnika gęstości mineralnej kości mierzonego w okolicy lędźwiowej, w populacji europejskiej i azjatyckiej oraz wartością wskaźnika gęstości mineralnej kości mierzonego w okolicy szyjki kości udowej w populacji europejskiej.

Dotychczasowe doniesienia dotyczące roli polimorfizmu 1181G>C w neuroosteopatii Charcota nie są jednoznaczne. Pitocco i wsp. [294] opisali związek tego wariantu genetycznego z neuroosteopatią – w badanej przez nich populacji włoskiej. Obecność allelu G wiązała się z występowaniem CN. Z kolei w badanej wcześniej grupie polskich pacjentów [309] nie znaleziono takiego związku.

Również w obecnej pracy, wyniki analizy korelacji pomiędzy wariantem 1181G>C genu osteoprotegeryny a występowaniem neuroosteopatii nie

potwierdzają takiej zależności. W badanej populacji nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą chorych z neuroosteartropatią (CN) a grupą pacjentów tylko z neuropatią (N). Podobnie jak w poprzednim badaniu różnice w częstości genotypów występowały tylko pomiędzy grupą z neuroosteartropatią (CN) a grupą kontrolną (C). Z tego względu polimorfizm ten potencjalnie mógłby być rozważany jako marker neuroosteartropatii, charakterystyczny jedynie dla grupy chorych z tym powikłaniem.

Wariant genetyczny 1217C>T genu osteoprotegeryny był badany relatywnie rzadziej. Jest on zlokalizowany w intronie, w odległości 15 par zasad od pierwszego eksonu. W badaniu Langhda [296] stwierdzono, że genotyp CC polimorfizmu 121C>T rzadziej występował u osób ze złamaniami kości kręgosłupa. Polimorfizm ten znajdował się w całkowitym sprzężeniu z 149T>C, 209G>A, 245T>G i 4441C>T. W konsekwencji każdy z tych wariantów genowych, jak stwierdzają autorzy, może mieć wpływ na ryzyko złamań. Z kolei w populacji chińskich kobiet Wang [366] wykazał korelację wariantu genowego 1217C>T genu *OPG* z podwyższonym ryzykiem złamania kości.

W cytowanej wcześniej pracy Brandstroma [299] w populacji starszych kobiet nie potwierdzono takiego związku. Korelacji tego polimorfizmu z BMD nie obserwowali również Arko [367] w populacji 136 kobiet po okresie menopauzy.

Polimorfizm 1217C>T genu *OPG* w kontekście powiązania z neuroosteartropatią Charcota, był dotychczas oceniany tylko we wcześniej wspomnianych badaniach własnych [309]. Analiza badanej wówczas populacji wykazała dodatnią korelację pomiędzy genotypem TT a występowaniem neuroosteartropatii.

W obecnym badaniu na większej grupie chorych związek ten nie został jednak potwierdzony. Istotna różnica w częstości występowania genotypów tego polimorfizmu u badanych w niniejszej pracy chorych występowała tylko pomiędzy grupą chorych z neuropatią bez neuroosteartropatii (N) a grupą kontrolną (C) co pozwala na rozważanie roli tego polimorfizmu jako markera neuropatii.

W przypadku ostatniego analizowanego **polimorfizmu genu osteoprotegeryny 6890A>C**, w badanej w niniejszej pracy populacji najczęściej występował genotyp AA. Najrzadziej obserwowano drugi z genotypów homozygotycznych CC. Stwierdzano go jedynie u kilku procent osób. Dotyczyło to wszystkich grup

chorych jak i grupy kontrolnej. Istotną różnicę w częstości występowania tego polimorfizmu stwierdzono pomiędzy grupą chorych z neuroosteopatią (CN), a chorymi na cukrzycę bez neuropatii (D) oraz chorymi na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C). Wobec powyższych rezultatów polimorfizm 6890A>C genu *OPG* można by wskazywać jako potencjalny marker cukrzycy oraz jako polimorfizm różnicujący grupę pacjentów z ryzykiem rozwoju neuroosteopatii Charcota w populacji osób chorych na cukrzycę. Polimorfizm ten był stosunkowo rzadko analizowany przez innych badaczy. Langhdał w swojej pracy [296] nie znalazła różnic w rozkładzie polimorfizmu 6890A>C pomiędzy grupą chorych z osteoporozą a osobami zdrowymi. Również w przeprowadzonych wcześniej badaniach własnych dotyczących cukrzycy [309] nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami : chorych z neuroosteopatią, cukrzycą i neuropatią oraz grupą kontrolną.

Polimorfizmy genu *RANKL*

Metabolizm kości uwarunkowany jest wzajemną interakcją cytokin OPG i RANKL. Nasilenie procesu resorpcji kostnej zależy od wzajemnego stosunku OPG i RANKL . RANKL jest końcowym efektem genetyki osteoklastów i jest to cytokina odpowiedzialna za osteolizę .Zmienność sekwencji w kodującym ją genie może mieć związek z większą utratą masy kostnej. Zagadnienie roli polimorfizmów genu *RANKL* w rozwoju neuroosteopatii Charcota nie było dotychczas przedmiotem publikacji. Polimorfizmy te badano natomiast w kontekście innych schorzeń układu kostnego-przed wszystkim w osteoporozie.

W pracy Mencej z roku 2006 [353] analizowano związek czterech polimorfizmów genu *RANKL*: 290C>T, 643C>T, 693G>C oraz 1594G>A z ryzykiem wystąpienia osteoporozy w grupie 115 kobiet w wieku pomenopauzalnym . Autorzy stwierdzili że polimorfizm 290C>T może mieć udział w genetycznej regulacji masy kostnej mierzonej w okolicy szyjki kości udowej. Genotyp CC w analizowanej populacji miał związek z niższą masą kostną. Polimorfizm ten, podobnie jak dwa pozostałe zlokalizowany był w rejonie promotora genu.

W przypadku polimorfizmu 693G>C obserwowano jego związek z szybkością utraty masy kostnej. Wyniki kolejnej pracy opublikowanej przez tę samą autorkę [368] z udziałem większej liczby kobiet potwierdziły możliwy związek badanych polimorfizmów (290C>T, 643C>T, 693G>C) z rozwojem osteoporozy.

Również Dong i wsp.[301] obserwowali istotną korelację polimorfizmów genu *RANKL* rs12585014, rs7988338 oraz rs2148073 z innym parametrem obrazującym stan kośćca, wytrzymałością szyjki kości udowej. Dwa pierwsze z tych polimorfizmów, podobnie jak polimorfizmy analizowane przez Mencej, znajdowały się w rejonie promotora. Nie wszystkie prace potwierdzają jednak rolę polimorfizmów genu *RANKL* w rozwoju osteoporozy.

Roshandel [298] opublikował wyniki analiz przeprowadzonych na subpopulacji mężczyzn z badania EMAS (*European Male Ageing Study*) i nie wykazał związku występowania polimorfizmów genu *RANKL* z gęstością mineralną kości wyrażaną w g/cm^2 (w badaniu tym uwzględniono cztery polimorfizmy *RANKL*: rs346588, rs9562414, rs633137 oraz rs346574).

Z uwagi na stwierdzaną w przypadku neuroosteopatii Charcota osteopenię, polimorfizm genu kodującego *RANKL* mógłby, w świetle powyższych badań, mieć związek z rozwojem tego powikłania w grupie chorych z neuropatią cukrzycową.

W analizowanej populacji badano **trzy polimorfizmy genu *RANKL***: 290C>T, 643C>T oraz 693G>C.

W przypadku pierwszego z analizowanych polimorfizmów (**290C>T**) nie stwierdzono różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy badanymi grupami

Spśród genotypów **polimorfizmu 643C>T** genu *RANKL* w żadnej z grup chorych na cukrzycę (CN, N i D) nie obserwowano występowania homozygot TT, również w grupie kontrolnej genotyp ten obserwowano tylko u 1% osób. Istotną różnicę w rozkładzie polimorfizmów stwierdzono pomiędzy obiema grupami chorych z neuropatią (grupa z neuroosteopatią CN i bez neuroosteopatii N) a pacjentami z cukrzycą bez neuropatii (D) oraz pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C). Wśród pacjentów w grupie CN i N zdecydowanie dominowały heterozygoty CT, natomiast w grupie pacjentów z cukrzycą bez neuropatii (D) liczba homozygot CC i heterozygot CT była zbliżona. Tak więc rolę tego polimorfizmu można by rozważać jako markera cukrzycy, mógłby on różnicować również grupę chorych z neuropatią (zarówno z neuroosteopatią Charcota jak i pacjentów tylko z neuropatią).

Rozkład genotypów **polimorfizmu 693G>C** genu *RANKL* różnił się w obecnym materiale tylko pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C) co może skłaniać do rozważania roli tego polimorfizmu jako markera ryzyka zachorowania na cukrzycę.

Ostatnią cytokiną z triady OPG/RANKL/RANK zaangażowaną w procesy kościotworzenia i osteolizy jest RANK.

Polimorfizmy genu *RANK*

Wyniki badań oceniających związek polimorfizmu genu *RANK* z różnymi parametrami charakteryzującymi tkankę kostną nie są jednoznaczne, wiele z nich wskazuje jednak na możliwy udział polimorfizmu tego genu w patogenezie osteoporozy.

Kim w swojej pracy [352] nie potwierdził roli polimorfizmów genu *RANK* 421C>T oraz 575C>T jako czynników genetycznych wpływających na BMD, natomiast Koh w badaniu obejmującym koreańskie kobiety w wieku pomenopauzalnym [369] opisał znamieny związek polimorfizmów *RANK*: 34863G> A (rs12458117) i polimorfizmu 35928insdelC, z gęstością mineralną kości w okolicy lędźwiowej kręgosłupa i proksymalnego odcinka kości udowej.

W przedstawionych powyżej doniesieniach analizowane były różne polimorfizmy, oceniano także różne parametry tkanki kostnej. Nie wszystkie potwierdzają rolę polimorfizmu genu *RANK* w rozwoju osteoporozy, wskazują jednak na możliwy udział zmienności dotyczącej tego genu w powstawaniu osteopenii. Podobnie jak w przypadku polimorfizmu *RANKL* hipoteza ta nie była badana w odniesieniu do neuroosteartropatii Charcota.

W niniejszej pracy analizowano związek dwóch polimorfizmów genu *RANK* 421C>T (rs35211496) oraz 575C>T (rs1805034) z występowaniem CN.

Dla **polimorfizmu 421C>T** istotna różnica rozkładu genotypów występowała jedynie pomiędzy grupą chorych z neuroosteartropatią Charcota (CN) a chorymi na cukrzycę bez neuropatii (D) a dla **polimorfizmu 575C>T** pomiędzy grupą chorych z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C). Wyniki tej analizy nie wydają się wskazywać na rolę tych polimorfizmów jako specyficznych markerów neuroosteartropatii. Polimorfizm 421C>T mógłby różnicować grupę pacjentów z ryzykiem rozwoju neuroosteartropatii a polimorfizm 575C>T grupę chorych o podwyższonym ryzyku rozwoju neuropatii w populacji chorych na cukrzycę.

7.3. Omówienie i dyskusja dotycząca analizy nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów

Zjawisko nierównowagi sprzężeń polega na **nieprzypadkowym, wspólnym dziedziczeniu alleli** różnych genów, znajdujących się w **odmiennych loci**. To wspólne dziedziczenie występuje w danej populacji częściej, niż wynikałoby z losowej częstości występowania każdego z tych alleli z osobna.

W przypadku potwierdzenia istnienia związku pewnego polimorfizmu z chorobą powstaje pytanie, czy ma on bezpośredni wpływ na większe prawdopodobieństwo zachorowania, czy też występuje tylko w nierównowadze sprzężeń (LD – *linkage disequilibrium*), czyli jest jedynie dziedziczony łącznie z innym polimorfizmem, który jest odpowiedzialny za rozwój choroby. Wysoka nierównowaga sprzężeń oznacza że dane polimorfizmy są najczęściej dziedziczone wspólnie. Jeśli wiadomo że dwa polimorfizmy pozostają ze sobą w nierównowadze sprzężeń informacja o tym że jeden wariant polimorficzny występuje u danej osoby pozwala wnioskować o obecności również drugiego wariantu polimorficznego. W praktyce stwarza to szansę zawężenia badań genetycznych i możliwość oznaczania tylko wybranych polimorfizmów z danej grupy alleli pozostających w nierównowadze sprzężeń. Korelacje pomiędzy markerami znajdującymi się na genomie blisko siebie mogą również różnić się między populacjami. Powoduje to że marker ściśle związany z wariantem przyczynowym danego schorzenia w jednej populacji, w innej może wykazywać jedynie słabe powiązanie z tym schorzeniem. Dlatego by móc oszacować rzeczywisty haplotyp korelujący z fenotypem chorobowym niezbędne jest przeprowadzenie szerszych badań (obejmujących zróżnicowane populacje), które potwierdziłyby uzyskane wyniki. Identyfikacja właściwego dla danego schorzenia polimorfizmu opiera się na badaniu siły jego związku z chorobą, potwierdzeniu tej obserwacji w innych populacjach, analizie cech ilościowych, badaniu na modelach zwierzęcych i w innych eksperymentach, które ostatecznie wykażą istnienie związku między tym wariantem sekwencji a patogenezą choroby. Jednak wstępne badania oparte na poszukiwaniu polimorfizmów, które mogą wskazywać na molekularne podłoże lub korelację z ryzykiem rozwoju choroby, nawet jeśli byłyby ograniczone jedynie do badanej populacji, odgrywają istotną rolę. Mogą one dostarczyć cennych informacji dotyczących markerów choroby w danej grupie etnicznej lub konkretnej populacji i stać się podstawą do poszukiwania takich związków w innych populacjach.

W analizowanej w niniejszej pracy populacji w genie osteoprotegeryny widoczne są różnice w nierównowadze sprzężeń. W grupie osób z cukrzycą bez neuropatii (D) jedna para polimorfizmów (950T>C i 6890A>C) ulega kosegregacji, czyli jest dziedziczona wspólnie, czego nie obserwuje się w grupie kontrolnej. Z kolei wśród pacjentów z neuropatią (N) obserwuje się sprzężenie pięciu par polimorfizmów (245T>G i 1181G>C, 950T>C i 1181G>C, 245T>G i 1217C>T, 1181G>C i 1217C>T, 950T>C i 6890A>C), podobnie jak w grupie kontrolnej. W grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN) stwierdza się kosegregację trzech par polimorfizmów (950T>C i 1181G>C, 245T>G i 1217C>T oraz 950T>C i 6890A>C). W przypadku dwóch z nich (950T>C i 1181G>C oraz 245T>G i 1217C>T) relacji tej nie obserwuje się w grupie kontrolnej. Wyraźnie zaznacza się relacja dwóch polimorfizmów: 950T>C i 1181G>C oraz 245T>G i 1217C>T, która u osób z neuroosteopatią jest bardzo silna, a u osób z grupy kontrolnej znacznie słabsza. Jest to wyraźny przykład różnic w sile kosegregacji polimorfizmów u pacjentów, u których rozwinęła się neuroosteopatia w porównaniu z grupą kontrolną.

W genie *RANKL* nie uwidoczniło się żadnych różnic w nierównowadze sprzężeń badanych polimorfizmów pomiędzy analizowanymi grupami.

Z kolei w genie *RANK* sprzężeń nie obserwowano w grupie chorych z neuroosteopatią Charcota (CN), a w grupie pacjentów z neuropatią (N) kosegregacja była słaba w odróżnieniu od grupy kontrolnej (C), w której stwierdzono silną nierównowagę sprzężeń pomiędzy dwoma analizowanymi polimorfizmami.

Obserwowane pojedyncze różnice w profilach kosegregacji nie mogą stanowić podstawy do uznania ich za przyczynę rozwoju neuroosteopatii Charcota ani też nie mogą na tym etapie być wykorzystane w molekularnych badaniach diagnostycznych, ale w przypadku dwóch badanych genów – genu osteoprotegeryny oraz genu *RANK* stwierdzono różnice w nierównowadze sprzężeń pomiędzy badanymi grupami chorych a grupą kontrolną składającą się z osób zdrowych co może świadczyć o istniejących różnicach w przekazywaniu cech dziedzicznych.

Oznacza to, iż czynnik genetyczny z pewnością odgrywa pewną rolę w patogenezie choroby. Badana neuroosteopatia Charcota nie jest jednak chorobą monogenową, w której wykonanie testów genetycznych daje jednoznaczny wynik, gdyż w tym przypadku istnieje wiele elementów, których współistnienie determinuje przebieg choroby. Czynnikiem genetycznym może być jednym ze wspo-

magających markerów umożliwiających wskazanie ryzyka rozwoju choroby czy też ułatwiających wczesną diagnozę.

7.4. Omówienie i dyskusja dotycząca stężeń osteoprotegeryny, RANKL i RANK w w surowicy krwi w cukrzycy i jej powikłaniach

Zgodnie z najnowszymi teoriami uważa się, że do zapoczątkowania procesu neuroosteoartropatii przyczyniają się cytokiny prozapalne [183,188] które aktywują szlak metaboliczny OPG/RANKL/RANK odpowiedzialny za regulację dojrzewania i funkcji osteoklastów. RANKL nasila ekspresję NF kappaB, czynnika stymulującego dojrzewanie osteoklastów, wpływającego jednocześnie na ekspresję osteoprotegeryny – cytokiny hamującej działanie RANKL i osteolizę. Ta sama ścieżka sygnałowa jest zaangażowana w proces kalcyfikacji ścian naczyń, który często obserwowany jest w przebiegu neuropatii a zwłaszcza neuroosteoartropatii Charcota [118,241,277].

Dotychczas opublikowano liczne badania (dotyczyły one głównie osteoporozy), w których próbowano określić związek pomiędzy poziomem OPG w surowicy a wskaźnikiem gęstości mineralnej kości (BMD). Wyniki tych badań nie są jednoznaczne. W jednym z nich [370] wykazano dodatnią korelację pomiędzy obniżonymi poziomami OPG a niskim BMD i występowaniem złamań kręgow. Z kolei kilka lat wcześniej w pracy Yano [371] w populacji japońskiej stwierdzono podwyższone poziomy OPG w surowicy krwi u kobiet z osteoporozą.

W 2008 r. podczas konferencji Międzynarodowej Grupy Badawczej Stopy Cukrzycowej (DFSG – *Diabetic Foot Study Group*) Edmonds i wsp.[372] przedstawiali wyniki analizy poziomów OPG u chorych z neuropatią cukrzycową i bez tego powikłania. Stężenie OPG w surowicy krwi pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 oraz neuropatią były istotnie wyższe niż w grupie osób bez neuropatii – odpowiednio 5,1 (3,8-6,1) pmol/l i 3,9 (3,0-4,9) pmol/l oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych 2,9 (2,6-3,8) pmol/l. Ponadto poziomy OPG istotnie korelowały z kalcyfikacją naczyń ocenianą na podstawie radiogramów. Podczas tego samego spotkania prezentowano wyniki oznaczenia poziomów OPG w odniesieniu do polimorfizmów genu tej cytokiny u chorych na cukrzycę z obecnością neuroosteoartropatii i bez tego powikłania [373]. W powyższym badaniu nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy wariantami genetycznymi *OPG* oraz pozio-

mem osteoprotegeryny w surowicy krwi a cukrzycą z CN lub bez tego powikłania.

Hipoteza o możliwej roli układu OPG/RANKL/RANK w rozwoju neuroosteoartropatii Charcota oparta jest na znajomości faktu udziału tych samych cytokin w osteolizie oraz procesie kalcyfikacji naczyń, który często towarzyszy neuropatii a neuroosteoartropatii w prawie wszystkich przypadkach [118].

Polimorfizm genu *OPG* czy *RANKL* zlokalizowany w rejonie promotora mógłby wpływać na ekspresję genu a w konsekwencji na stężenie tych cytokin w surowicy krwi.

W analizowanej w niniejszej pracy populacji średni poziom osteoprotegeryny w surowicy krwi był znamienne wyższy w grupie osób z neuroosteoartropatią (CN) i neuropatią (N) (wynosił odpowiednio $6,6 \pm 3,0$ pmol/l i $6,3 \pm 1,7$ pmol/l) w porównaniu z chorymi na cukrzycę bez neuropatii (D) ($4,8 \pm 2,4$ pmol/l). Dane te w odniesieniu do grupy z neuropatią są zgodne z wynikami Edmonsa omawianymi wyżej. Różnica w średnim stężeniu tej cytokiny pomiędzy grupą CN i N nie była istotna statystycznie. Wysokie stężenia osteoprotegeryny – cytokiny o potencjalnym ochronnym działaniu w stosunku do tkanki kostnej – w populacji chorych z neuroosteoartropatią, której zawsze towarzyszy osteopenia można tłumaczyć mechanizmem kompensacyjnym. Jego celem byłoby ograniczenie osteolizy wywołanej przez RANKL. Można sądzić, że przyczyną braku skuteczności takiego mechanizmu mógłby być polimorfizm genu *OPG* i związane z nim zaburzenia funkcjonowania produktu białkowego tego genu - obniżenie aktywności osteoprotegeryny w stosunku do prawidłowej formy tej cytokiny.

Poziom RANKL był najniższy w grupie pacjentów z neuroosteoartropatią (CN) i w grupie chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) (odpowiednio $0,38 \pm 0,9$ pmol/l i $0,50 \pm 0,44$ pmol/l) natomiast w grupie z neuropatią (N) był najwyższy – $2,6 \pm 1,8$ pmol/l. Wynik ten jest zaskakujący. Teoretycznie podwyższony poziom RANKL w neuropatii można by wiązać z utratą neuropeptydów w sytuacji uszkodzenia i obumierania neuronów. Niektóre z nich np. peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP – *calcitonine gene related polipeptide*) powodują zmniejszenie ekspresji genu *RANKL* [183,258]. Wówczas jednak podwyższonego poziomu RANKL należałoby się spodziewać również w grupie osób z neuroosteoartropatią (CN), jednak w tej grupie poziom RANKL w surowicy krwi był niższy – być może częściowo na skutek działania OPG. W tej sytuacji można by rozważyć istnienie swego rodzaju rozkojarzenia mechanizmu współdziałania cytokin osi OPG/RANKL/RANK u pacjentów z neuropatią.

Nybo i wsp.[374] oceniali związek poziomu OPG z występowaniem neuropatii u chorych na cukrzycę typu 1 i 2. W cukrzycy typu 2 stężenie OPG było wyższe w grupie z neuropatią i wykazywał związek z występowaniem tego powikłania, jednak w modelu regresji wieloczynnikowej związek ten zanikał, podobnie jak w przypadku cukrzycy typu 1. Dotychczas nie opublikowano jeszcze żadnych prac w których oceniano by poziom RANKL u chorych z neuropatią cukrzycową, tak więc zagadnienie to wymaga dalszych badań na większych grupach chorych.

7.5. Omówienie i dyskusja dotycząca poziomów OPG i RANKL w surowicy krwi i polimorfizmów genów tych cytokin

Kolejnym etapem analizy była ocena wpływu poszczególnych polimorfizmów genów *OPG* i *RANKL* na poziom tych cytokin w surowicy krwi. Zagadnienie to dotyczyć może szczególnie polimorfizmów zlokalizowanych w rejonie promotora, które mogą mieć potencjalny wpływ na ekspresję genu.

W całej analizowanej grupie chorych, w przypadku **osteoprotegeryny** zaobserwowano istotną różnicę w stężeniu tej cytokiny w odniesieniu do poszczególnych genotypów polimorfizmu 245T>G. Stwierdzono istotnie wyższy poziom OPG w przypadku występowania genotypu heterozygotycznego TG (7,5±2,1 pmol/l) w porównaniu z genotypem homozygotycznym TT (5,8±2,6 pmol/l) (p=0,043). Dla polimorfizmu 1217C>T genu osteoprotegeryny genotyp C/T wiązał się z wyższym stężeniem tej cytokiny (p=0,045). Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu osteoprotegeryny w osoczu dla żadnego z genotypów polimorfizmów genu *RANKL* natomiast średni poziom osteoprotegeryny był wyższy u pacjentów z genotypem C/T polimorfizmu 421C>T (p=0,047) genu *RANK*. Analiza wariancji w poszczególnych grupach pacjentów wykazała zależność pomiędzy występowaniem polimorfizmu 245 T>G a poziomem OPG w grupie neuropatii (N) (p=0,015), pomiędzy poziomem OPG a polimorfizmem 950T>C w grupie osób z neuroosteoartropatią (CN) (p=0,033), poziomem osteoprotegeryny a polimorfizmem 1217C>T w grupie pacjentów z neuropatią (N) (p=0,0448) oraz poziomem RANKL i polimorfizmem 421 C>T również w grupie chorych neuropatią (N) (p=0,042). Tak więc zależność poziomu białka od genotypu jest najlepiej widoczna w grupie osób z neuropatią.

7.6. Podsumowanie

W niniejszej pracy analizowano pięć polimorfizmów genu *OPG*, trzy polimorfizmy genu *RANKL* oraz dwa polimorfizmy genu *RANK* w populacji polskiej osób chorych na cukrzycę podzielonych na trzy grupy: pacjentów z neuroosteopatią (CN), chorych z neuropatią bez neuroosteopatii (N) oraz pacjentów tylko z cukrzycą, nie obciążonych neuropatią (D). Badaniami objęto również grupę kontrolną (C). Wyniki badań potwierdzają hipotezę dotyczącą roli polimorfizmu genów triady *OPG/RANKL/RANK* w rozwoju neuroosteopatii Charcota. Szczegółowa analiza wykazała statystycznie istotną różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 245T>G genu *OPG* pomiędzy grupą z neuroosteopatią Charcota a grupą pacjentów z neuropatią bez neuroosteopatii. Wykazano związek tego polimorfizmu z neuroosteopatią Charcota – obserwowano dodatnią korelację genotypu TT z występowaniem tego powikłania.

Podobnie jak we wcześniejszych naszych badaniach w analizowanej populacji obserwowano znamienne różnice w częstości występowania polimorfizmu 1181G>C genu *OPG* pomiędzy grupą pacjentów z neuroosteopatią a grupą kontrolną. W oparciu o uzyskane wyniki wydaje się, że polimorfizm ten może spełniać kryteria potencjalnego markera neuroosteopatii, charakterystycznego tylko dla tego powikłania. Również polimorfizm 6890 A>C genu *OPG* można rozważać jako marker różnicujący grupę pacjentów z ryzykiem rozwoju neuroosteopatii Charcota w populacji osób chorych na cukrzycę. Nie potwierdzono natomiast wcześniejszej obserwacji korelacji polimorfizmu 1217C>T genu *OPG* z występowaniem neuroosteopatii Charcota.

Wśród polimorfizmów genów pozostałych cytokin polimorfizm 421C>T genu *RANK* można brać pod uwagę jako marker, który różnicuje pacjentów z ryzykiem rozwoju neuroosteopatii Charcota wśród chorych na cukrzycę. Ponadto przeprowadzone analizy wskazują na potencjalną możliwość zastosowania polimorfizmów genu *OPG*: 245T>G, 950T>C, 1217C>T, polimorfizmów genu *RANKL* 643C>T oraz polimorfizmu genu *RANK* 575C>T jako markerów neuropatii. Dwa spośród analizowanych polimorfizmów genu *RANKL* 643C>T i 693G>C oraz *OPG* 6890A>C mogły by być brane pod uwagę jako markery cukrzycy. Analiza sprzężeń wykazała silną kosegregację dwóch par polimorfizmów genu *OPG*-950T>C i 1181G>C oraz 245T>G i 1217C>T wśród pacjentów z neuroosteopatią- w grupie kontrolnej relacja ta jest znacznie słabsza.

W przypadku polimorfizmów genu *RANK* obserwowano różnice w kosegregacji dwóch analizowanych polimorfizmów w grupie pacjentów z neuropatią w porównaniu z grupą kontrolną.

Stwierdzone różnice w nierównowadze sprzężeń polimorfizmów genu osteoprotegeryny oraz genu *RANK* pomiędzy badanymi grupami chorych a grupą kontrolną wskazują na rolę zmian na poziomie DNA w rozwoju neuroosteoartropatii Charcota w badanej grupie chorych.

Przeprowadzone badania mimo ograniczonej liczby pacjentów oraz analizy jedynie kilku wybranych loci polimorficznych, mogą przyczynić się do pełniejszego poznania molekularnych zmian istotnych dla zachorowania na neuroosteoartropatię Charcota. W celu dokładnej analizy wpływu czynników genetycznych wskazane byłoby przeprowadzenie badań genomowych, które obejmowałyby zróżnicowane etnicznie populacje chorych. Ponadto należałoby wykonać szczegółowe badania dotyczące wpływu polimorfizmu genów na strukturę i funkcje OPG. Identyfikacja wariantów genowych odpowiedzialnych za rozwój neuroosteoartropatii oraz mających wpływ na ekspresję osteoprotegeryny lub też pozostałych cytokin triady OPG/RANKL/RANK umożliwiłaby wczesną identyfikację pacjentów narażonych na rozwój tego powikłania a także celowaną terapię.

Analiza stężenia osteoprotegeryny i RANKL w badanych grupach chorych wykazała, że średni poziom OPG był najwyższy w grupie pacjentów z neuroosteoartropatią co może świadczyć o nieskutecznym mechanizmie kompensacyjnym. Natomiast najwyższe średnie stężenie RANKL cechowało grupę pacjentów z neuropatią – przyczyna tego zjawiska pozostaje niewyjaśniona.

W odniesieniu do innych czynników mających związek z rozwojem neuroosteoartropatii Charcota stwierdzono korelację wieku, czasu trwania cukrzycy oraz występowania retinopatii z występowaniem tego powikłania.

8. WNIOSKI

1. Układ cytokin OPG/RANKL/RANK może odgrywać rolę w etiopatogenezie neuroosteartropatii Charcota. Podwyższony poziom osteoprotegeryny obserwowany w grupie chorych z neuroosteartropatią oraz istotnie wyższy w tej grupie stosunek średniego stężenia OPG/RANKL może odzwierciedlać nieskuteczność mechanizmu kompensacyjnego mającego zahamować proces niszczenia tkanki kostnej.
2. Niewyjaśnione pozostaje zjawisko stwierdzonego wysokiego średniego stężenia RANKL w grupie chorych z neuropatią – było ono znamienne wyższe niż w pozostałych dwóch grupach. Może to wskazywać na zaburzenia współdziałania cytokin szlaku OPG/RANKL/RANK w grupie chorych z neuropatią. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.
3. Wyniki badań wydają się potwierdzać hipotezę odnośnie roli czynników genetycznych w patogenezie neuroosteartropatii Charcota. W szczególności potwierdzono związek występowania wariantu genetycznego 245T>G genu *OPG* z rozwojem neuroosteartropatii i dodatnią korelacją genotypu TT z występowaniem tego powikłania. Polimorfizm 1181G>C genu *OPG* może kandydować do roli potencjalnego markera neuroosteartropatii Charcota charakterystycznego jedynie dla tego powikłania. Warianty genetyczne: 6890A>C genu *OPG* oraz 412C>T genu *RANK* mogą być brane pod uwagę jako markery różnicujące osoby z podwyższonym ryzykiem rozwoju neuroosteartropatii w populacji pacjentów z cukrzycą.
4. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania wariantów genetycznych: genu *OPG*: 245T>G, 950T>C, 1217C>T, genu *RANKL* 643C>T oraz genu *RANK* 575C>T jako markerów neuropatii, a także polimorfizmów: genu *RANKL* 643C>T, 693G>C oraz *OPG* 6890A>C jako markerów cukrzycy.
5. Analiza związku poszczególnych badanych polimorfizmów z poziomami cytokin OPG i RANKL wykazała, że zależność pomiędzy poziomem białka a genotypem była najlepiej widoczna w grupie chorych z neuropatią.
6. Analiza nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów wykazała istnienie różnic w nierównowadze sprzężeń polimorfizmów genów

OPG i *RANK* pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną. Wskazuje to, że zmiany na poziomie DNA odgrywają rolę w rozwoju neuroosteartropatii Charcota.

7. Do czynników mogących mieć potencjalny związek z rozwojem neuroosteartropatii Charcota należą: wiek chorych, czas trwania cukrzycy oraz występowanie retinopatii.

9. PIŚMIENNICTWO

1. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011; 94(3), 311-321
2. Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414, 782-787
3. Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007;(30):S46-S47;
4. WHO/Europe Health Financing Analysis HFA Database, 2005
5. World Health Organization Consultation: Definition Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complication Part 1. Raport of WHO Cons. Geneva: WHO 1999
6. Ramachandran A., Snehalatha C., Satyavani K Sivasankari S, Vijay V. Type 2 diabetes in Asian-Indian urban children. *Diabetes Care* 2003; 26(4), 1022-1025
7. Drake A.J., Smith A., Betts P. Type 2 diabetes in obese white children. *Arch. Dis.* 2002; 86(3), 207-208
8. Young M.J., Boulton A.J., MacLeod A.F., Williams DR, Sonksen PH. A Multicentre Study of prevalence of diabetes peripheral neuropathy in the UK hospital clinic population. *Diabetologia* 1993; 36(2), 150-154
9. Rewers M. The changing face of the epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus. Research designs and models and disease causation. *Ann. Med.* 1991; 23, 419-426
10. Peczyńska J., Urban M., Florys B. Epidemiologia cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży w północno-wschodniej Polsce w okresie 1988-1999. *Endokrynol. Diabetol. Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2001; 7, 17-20
11. Kretowski A., Kowalska J., Peczyńska J. Urban M, Green A, Kinalska I. The large increase in incidence of Type 1 diabetes mellitus in Poland. *Diabetologia* 2001; 44 (3), 48-50
12. Karvonen M., Pitkaniemi J., Tuomilehto J. The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. The Finnish Childhood Diabetes Registry Group *Diabetes Care* 1996; 22(7), 1066-1070
13. Dabelea D. On behalf of SEARCH Study Group: The SEARCH for diabetes in youth study group. Abstracts of ADA. San Diego 2005; 124-OR
14. Naik R.G., Palmer J.P. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Rev. Endocr. Med. Disord.* 2003; 4(3), 233-241

15. Selby J.V., Ray G.T., Zhang D., Colby C.J. Excess costs of medical care for patients with diabetes in a managed care population. *Diabetes Care* 1997; 20(9), 1396-1402
16. Green A., Gale E.A., Patterson C. Incidence of childhood – onset insulin dependent diabetes mellitus the EURODIAB ACE Study. *Lancet* 1992; 339(8798), 905-909
17. Diabetes Epidemiology Research International Group. Geographic patterns of childhood –onset insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1988; 37, 1113-1119
18. Steck A.K., Rewers M.J. Genetics of type 1 diabetes. *Clin. Chem.* 2011; 57(2), 176-185
19. Weinberg C., Dornan T., Hansen J., Raghu P.K., Palmer J.P. HLA-related heterogeneity in seasonal patterns diagnosis in type1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1984; 26(3), 199-202
20. Erlich H.A., Griffith R.L., Bugawan T.L., Ziegler R., Alper C., Eisenbarth G. Implication of specific DQB1 alleles in genetic susceptibility and resistance by identification of IDDM siblings with novel HLA-DQB1 allele and unusual DR2 and DR1 haplotypes. *Diabetes* 1991; 40, 478-481
21. Ide A., Babu S.R., Robles D.T., Wang T., Erlich H.A., Bugawan T.L., Rewers M., Fain P.R., Eisenbarth G.S. “Extended” A1, B8, DR3 haplotype shows remarkable linkage disequilibrium but is similar to nonextended haplotypes in terms of diabetes risk. *Diabetes* 2005; 54(6), 1879-1883
22. Rewers A., Babu S., Wang T.B., Bugawan T.L., Barriga K., Eisenbarth G.S., Erlich H.A. Ethnic differences in the associations between the HLA-DRB1*04 subtypes and type 1 diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 1005, 301-309
23. Emery L.M., Babu S., Bugawan T.L., Norris J.M., Erlich H.A., Eisenbarth G.S., Rewers M. Newborn HLA-DR,DQ genotype screening: age- and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. *Pediatr. Diabetes* 2005; 6(3), 136-144
24. Owerbach D., Gabbay K.H. Localization of a Type I diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat region flanking the insulin gene. *Diabetes* 1993; 42, 1708-1714
25. Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T., Copeman J.B., Cordell H.J., Pritchard L.E., Reed P.W., Gough S.C., Jenkins S.C., Palmer S.M. A genomewide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371, 130-136

26. Owerbach D., Gabbay K.H. The HOXD8 locus (2q31) is linked to type I diabetes: interaction with chromosome 6 and 11 disease susceptibility genes. *Diabetes* 1995; 44(1), 132-136
27. Cox N.J., Wapelhorst B., Morrison V.A., Johnson L., Pinchuk L., Spielman R.S., Todd J.A., Concannon P. Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69(4), 820-830
28. Helmke K., Otten A., Willem S.W. Islet cells antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 1986; 29(1), 30-33
29. Ginsberg-Feller F., Witt M., Yagihashi S. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* 1984; 27, 87-89
30. Suenga K., Yoon J. Association of beta-cell specific expression of endogenous retrovirus with development of insulinitis and diabetes in NOD mouse. *Diabetes* 1988; 37, 1722-1726
31. Viskari H., Ludvigsson J., Uibo R., Salur L., Marciulionyte D., Hermann R., Soltész G., Füchtenbusch M., Ziegler A.G., Kondrashova A., Romanov A., Knip M., Hyöty H. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *J. Med. Virol.* 2004; 72(4), 640-617
32. Nerup J., Platz P., Andersen O.O. Christy M., Lyngsoe J., Poulsen J.E., Ryder L.P., Nielsen L.S., Thomsen M., Svejgaard A. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 1974; 2, 864-866.
33. Krętowski A. Rola komórkowego układu immunologicznego w patogenezie cukrzycy insulinozależnej. *Diabetologia Polska* 1995; 2, 237-243
34. Norris J., Barriga K., Klingensmith G. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*, 2003; 290, 1713-1720
35. Ziegler A., Schmid S., Huber H., Hummel M., Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 2003; 290(13), 1721-1728
36. Hales C., Barker D. Type 2 non insulin dependent) diabetes mellitus the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35, 595-601
37. Barker D.J. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002; 13, 346-348
38. Fronczak C., Baron A., Chase H., Ross C., Brady H.L., Hoffman M., Eisenbarth G.S., Rewers M., Norris J.M. In utero dietary exposures

- and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care* 2003; 26(12), 3237-3242
39. Hyponen E., Laara E., Reunanen A., Järvelin M.R., Virtanen S.M. Intake of vit. D and risk of type 1 diabetes: a birth cohort study. *Lancet* 2001; 358, 1500-1503
 40. Raheja B.S, Sadikot S.M., Phatak R. Significance of the n-3/n-6 ration for insulin action in diabetes *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1983; 683, 258-271
 41. Eisenbarth G.S.: Type 1 diabetes mellitus. A chronic autotimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314, 1360-1368.
 42. Wilkin T.J.: The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44, 914-921
 43. Weijnen C.F., Rich S.S., Meigs J.B., Krolewski A.S., Warram J.H. Risk of diabetes in sibilings of index cases type 2 diabetes: implication for genetic studies. *Diabet. Med.* 2002; 19, 41-50
 44. Martin B.C., Warram J.H., Rosner B., Rich S.S., Soeldner J.S., Krolewski A.S. Familial clustering of insulin sensitivity. *Diabetes* 1992; 41(7), 850-854
 45. Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T.H., Mashima H., Schwarz P.E., del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K.S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L.J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C.L., Bell G.I. Genetic variation in the gene encoding calpain 10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Net. Genet.* 2000; 26(4), 163-175
 46. Colditz G., Willett W.C., Rotnitzky A., Manson J.E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann. Intern. Med.* 1995; 122, 481-486
 47. Kennedy B., Ramachandran C. Protein tyrosine phosphatase 1B in diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 5, 877-883
 48. Adorini L. Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nat. Genet.* 2001; 27, 218-221
 49. Kabir M., Catalano K., Ananthnarayan S., Kim S.P., Van Citters G.W., Dea M.K., Bergman R.N. Molecular evidence supporting the portal theory a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005; 288(2), 454-461
 50. Tuomilehto J.J., Lindström J., Eriksson J.G., Valle T.T., Hämäläinen H., Ilanne-Parikka P., Keinänen-Kiukaanniemi S., Laakso M., Louheranta A., Rastas M., Salminen V., Uusitupa M. Finnish Diabetes Prevention Study Group: Prevention of type 2 diabetes mellitus by

- changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(18), 1343-1503
51. Salitell A.R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104, 517-529
 52. Pessin J.E., Salitell A.R. Signaling pathways in insulin action, molecular target of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106, 165-169
 53. DCCT Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1997; 46, 1829-1839
 54. Parving H., Viberti G., Keen H., Christiansen J.S., Lassen N.A. Hemodynamic factors in the genesis of diabetic microangiopathy. *Metabolism* 1983; 32(9), 943-949
 55. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. Advanced glycosylation and products in tissue and the biochemical basis of diabetes complications. *N. Engl. J. Med.* 1988; 313, 1315-1321
 56. Tesfaye S., Chaturvedi N.N., Eaton S.E., Ward J.D., Manes C., Ionescu-Tirgoviste C., Witte D.R., Fuller J.H. Eurodiab Prospective Complications Study Group: Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(4), 341-350
 57. Cameron N.E., Eaton S.E., Cotter M.A., Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001; 44, 1973-1988
 58. Cukrzyca t. II red. J. Sieradzki wyd. Via Medica Gdańsk rok 2006; str. 847-848.
 59. Cukrzyca t. II red. J. Sieradzki wyd. Via Medica Gdańsk rok 2006; str. 678
 60. Wierusz-Wysocka B. Związki patogenetyczne między mikro i makroangiopatii cukrzycową Cz. II. Nowe spojrzenie na patogenezę makroangiopatii cukrzycowej. *Diabetol. Prakt.* 2009; 5, 173-179
 61. Heart Protection Study Collaborative Group: MRC /BHF Heart Protection Study of cholesterol –lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes a randomized placebo controlled trial. *Lancet* 2003; 361, 2005-2016E
 62. Hoogeveen E., Kostense P., Jacobs S.C. Hyperhomocystynemia increased risk of death, especially in type 2 diabetes. 5 years follow-up of the Hoorn Study. *Circulation* 2000; 101, 1506-1511
 63. Lal M.A., Brismar H., Eklafl A. Role of oxidative stress in advanced glycation and product-induced mesangial cell activation. *Kidney Int.* 2002; 61, 2006-2014

64. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes *J. Hypertension* 2003; 21, 3-12
65. Doherty T.M., Fitzpatrick L.A., Inoue D., Qiao J.H., Fishbein M.C., Detrano R.C., Shah P.K., Rajavashisth T.B. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification: *Endocr. Rev.* 2004; 25(4), 629-672
66. Demer L.J. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory response to oxidized lipids. *Int. J. Epidemiol* 2002; 31, 737-741
67. Ndip A., Williams A., Jude E.B., Serracino-Inglott F., Richardson S., Smyth J.V., Boulton A.J., Alexander M.Y. The RANKL/RANK/OPG signaling pathway mediates medial arterial calcification in diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabetes*. 2011; 60(8), 2187-2196
68. Cianciolo G., La Manna G., Donati G., Persici E., Dormi A., Cappuccilli M.L., Corsini S., Fattori R., Russo V., Nastasi V., Coli L., Wratten M., Stefoni S. Coronary calcifications in end-stage renal disease patients: a new link between osteoprotegerin, diabetes and body mass index? *Blood Purif.* 2010; 29(1), 13-22
69. Pritzker L.B., Scatena M., Giachelli C.M. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15 (6), 2834-2841
70. Grausland J., Rasmussen L.M., Green A., Sjølie A.K. Does osteoprotegerin relate to micro- and macrovascular complications in long-term type 1 diabetes? *Scand J Clin Lab Invest.* 2010; 19, 70, 188-193.
71. Maser R.E., Mitchell B.D., Vinik A., Freeman R. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(15), 1986-1901
72. Mizuri S., Hemmi H., Kumanomidou H., Miyagi M., Sakai K., Aikawa A., Ohara T., Yamada K., Shimatake H., Hasegawa A. Angiotensin converting enzyme (ACE) I/G genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int.* 2001; 60(3), 1124-1130
73. Barzailay J., Wagram J.H., Rand L.I., Pfeifer M.A., Krolewski A.S. Risk for cardiovascular autonomic neuropathy is associated with the HLA-DR3/4 phenotype in Type I diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 1992; 116, 544-549
74. Valmadrid C., Klein R., Moss S. Klein B.E. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria in persons with

- older – onset diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160(8), 1093-1100
75. Consensus Statement. Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. *Diabetes* 1988; 37, 1000-1004
 76. Tesfaye S., Stevens L.K., Stephenson J.M., Fuller J.H., Plater M., Ionescu-Tirgoviste C., Nuber A., Pozza G., Ward J.D. Eurodiab IDDM Study Group. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: The Eurodiab IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1996; 39(11), 1377-1384
 77. Davies M., Brophy S., Williams R., Williams R., Taylor A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29(7), 1518-1522
 78. Tamer A., Yildiz S., Yildiz N., Kanat M., Gunduz H., Tahtaci M., Celebi H. The prevalence of neuropathy and relationship with risk factors in diabetic patients: a single-center experience. *Med. Princ. Pract.* 2006; 15(3), 190-194
 79. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne: Zalecenia Kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2006 r. *Diabetol. Pol.* 2006; 13, 48-51
 80. The Diabetes Control and Complications Trial group. The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. *Ann. Intern. Med.* 1995; 122, 561-568
 81. Dyck P., Davies J., Wilson D., Service F.J., Melton L.J. 3rd, O'Brien P.C. Risk factor for severity of diabetic polyneuropathy : intensive longitudinal assesment of the Rochester Diebetic Neuropathy Study cohort. *Diabetes Care* 1999; 22(9), 1479-1486
 82. Yasuda H., Terada M., Maeda K., Kogawa S., Sanada M., Haneda M., Kashiwagi A., Kikkawa R. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 2003; 69(4), 229-285
 83. Thomas P.K. Classification, differential diagnosis and staging of diabetes peripheral neuropathy. *Diabetes* 1997; 46, 54-57
 84. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414, 813-820
 85. Brownlee M. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6), 1615-1625
 86. Bohlen H.G, Nase G.P. Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia induced beta PKC activation. *Am. J. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280(2), 621-627

87. Zanone M.M., Peakman M., Purewal T., Watkins P.J., Vergani D. Autoantibodies to nervous tissue structures are associated with autonomic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36(6), 564-569
88. Kempler P., Tesfaye S., Chaturvedi N., Stevens L.K., Webb D.J., Eaton S., Kerényi Z., Tamás G., Ward J.D., Fuller J.H. Eurodiab IDDM Complications Study. *Diabet. Med.* 2002; 19(11), 900-909
89. Doupis J., Lyons T.E., Wu S., Gnardellis C., Dinh T., Veves A. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(6), 2157-2163.
90. Tesfaye S., Malik R., Harris N., Jakubowski J.J., Mody C., Rennie I.G., Ward J.D. Arteriovenous shunting and proliferating new vessels in acute painful neuropathy of rapid glycemic control. *Diabetologia* 1996; 39(3), 329-335
91. Ewing D.J., Campbell I.W., Clarke B.F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q. J. Med.* 1980; 49(193), 95-108
92. Lluch I., Hernandez A., Real J.T., Morillas C., Tenés S., Sánchez C., Ascaso J.F. Cardiovascular autonomic neuropathy in type 1 diabetic patients with and without peripheral neuropathy. *Diabetes Res. Clin. Parc.* 1998; 42(1), 35-40
93. Sieradzki J., Koblik T. red.: Zespół stopy cukrzycowej. Wyd. Via Medica Gdańsk 2009; str. 28
94. Ziegler D., Dannehl H., Volksw D., Mühlen H., Spüler M., Gries F.A. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis and standard tests of heart rate variation in newly diagnosed IDDM patients. *Diabetes Care* 1992; 15(7), 908-911
95. O'Brien I.A.D., O'Hare J.P., Lewin I.G., Corral R.J. The prevalence of autonomic neuropathy in insulin-dependent diabetes mellitus: a controlled study based on heart rate variability. *Q. J. Med.* 1986; 61(234), 957-967
96. O'Brien I.A.D., McFadden J.P., Corral R.J. The influence of autonomic neuropathy on mortality in insulin-dependent diabetes. *QJM* 1991; 79(290), 495-502
97. Valensi P., Paries J., Attali J.R. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity and microangiopathic complications — the French multicenter study. *Metabolism* 2003; 52(7), 815-820.
98. Carnethon M.R., Golden S.H., Folsom A.R., Haskell W., Liao D. Prospective investigation of autonomic nervous system function and the

- development of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study, 1987-1998. *Circulation* 2003; 107(17), 2190-2195
99. Edmonds M.E.: Autonomic neuropathy In De Forenzo RA, Ferrannini E, Keen H and Zimmet Paul Eds International Textbook of Diabetes; 3rd ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England 2004; 70(2), 1263-1282.
 100. Smith A.G., Russel J., Feldman E.L., Goldstein J., Peltier A., Smith S., Hamwi J., Pollari D., Bixby B., Howard J., Singleton J.R. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2006; 29(6), 1294-1299
 101. Young M.J., Adams J.E., Anderson G.F. , Boulton AJ, Cavanagh PR. Medical arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non diabetic control subject. *Diabetologia* 1993; 36(7), 615-621
 102. Shaw K.M. Powikłania cukrzycy wyd.1998 r. Via Medica (tłum.ang) Rozdz. VII, str. 155.
 103. Veves A., Masson E.A., Fernando D.J. , Boulton A.J. Studies of experimental hosiery in diabetic neuropathic patients with high foot pressures. *Diabet. Med.* 1990; 7(4) 324-326
 104. Frykberg R.G., Lavery L.A., Pham H., Harvey C., Harkless L., Veves A. Role of neuropathy and high foot pressures in diabetic foot ulceration. *Diabetes Care* 1998; 21(10), 1714-1719
 105. European Working Group on Critical Leg Ischemia. Second European Consensus Document on Chronic Critical Leg Ischaemia. *Eur. J. Vasc. Surg.* 1992; 6 (supl. A).
 106. Farber D.C., Juliano P.J., Cavanagh P.R., Ulbrecht J., Caputo G. Single stage correction with external fixation of the ulcerated foot in individuals with Charcot neuropathy. *Foot Ankle Int.* 2002; 23(2), 130-134
 107. Kelly M. De Arthritide Symptomata of William Musgrave (1657-1721): His Description of Neuropathic Arthritis. *Bull Hist. Med.* 1963; 37, 372-377
 108. The diabetic Charcot foot: Principles and management. Red. R.G. Frykberg. Wyd. Data Trace Publishing Company, Maryland, 2009; s. 1-11
 109. Jeffcoate W., Limat J., Nobrega L. The Charcot foot. *Diabetic Medicine* 2000; 17(4), 253-258
 110. Frykberg R., Belczyk R. Epidemiology of the Charcot foot” *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 2008; 25(1), 17-28
 111. Bailey C.C., Root H.F. Neuropathic foot lesions in diabetes mellitus. *N Eng J Med.* 1947; 236(11), 397-401

112. Miller D.S., Lichtman W.F. Diabetic neuropathic arthropathy of feet: summary report of seventeen cases. *AMA Arch Surg.* 1955; 70(4), 513-518.
113. Eichenholtz S.N. Charcot joints. Springfield Illinois: Charles C. Thomas 1966
114. Shibata T., Tada K., Hashizume C. The results of arthrodesis of the ankle for leprotic neuroarthropathy. *J Bone Joint Surg Am*, 1990; 72(5), 749-756
115. Johnson J.T. Neuropathic fractures and joint injuries. Pathogenesis and rationale of prevention and treatment. *J Bone Joint Surg Am*, 1967; 49(1), 1-30
116. Rogers L.C., Frykberg R.G., Armstrong D.G., Boulton A.J., Edmonds M., Van G.H., Hartemann A., Game F., Jeffcoate W., Jirkovska A., Jude E., Morbach S., Morrison W.B., Pinzur M., Pitocco D., Sanders L., Wukich D.K., Uccioli L. The Charcot foot in diabetes *Diab. Care* 2011; 34(9), 2123-2129
117. Hartemann-Heurtier A., Ha Van G., Grimaldi A. The Charcot foot. *Lancet* 2002; 360, 1776-1778
118. Sinha S., Munichoodappa C., Kozak G.P. Neuro-arthropathy (Charcot joints) in diabetes mellitus: a clinical study of 101 cases. *Medicine (Baltimore)* 1972; 51, 191-210.
119. Fabrin J., Larsen K., Holstein P. Long term follow up in diabetic Charcot feet with spontaneous onset. *Diabetes Care* 2000; 23, 796-800
120. Pakarinen T., Laine H.J., Honokonen S.E., Peltonen J., Oksala H., Lahtela J. Charcot arthropathy of the diabetic foot. Current Concepts and Review of 36 cases. *Scand. J. Surg.* 2002; 91(2), 195-201
121. Lee L., Blume P., Sumpio B. Charcot joint disease in diabetes mellitus. *Ann.Vasc.Surg.* 2003; 17, 571-580
122. Gazis A., Pound M., Macfarlane R., Treece K., Game F., Jeffcoate W. Mortality in patients with diabetic neuropathy osteoarthropathy (Charcot foot). *Diabet. Med.* 2003; 21(2), 1243-1246
123. Lavery L., Armstrong D., Wunderlich R., Tredwell J., Boulton A.J. Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and whites from diabetic management cohort. *Diabetes Care* 2003; 26(5), 1435-1438
124. Molines L., Darmon P., Raccach D. Charcot's foot: newest findings on its pathophysiology, diagnosis and treatment. - *Diabetes Metab* 2010; 36 (4), 251-255

125. Cofield R.H., Matrisin M., Beabout J. Diabetic neuroarthropathy in the foot patients characteristic and patterns of rtg changes. *Foot Ankle Int.* 1983; 4, 15-22
126. Sanders L.J., Frykberg R.G. Charcot neuroarthropathy of the foot. In Levin and O'Neal's *The Diabetic Foot*, 6th ed. Bowker J.H., Pfeifer M.A., Eds. Mosby, 2001; 439-465
127. Armstrong D.G., Peters E.J, Charcot arthropathy of the foot. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc* 2002; 92(9):390-394
128. Rajbhandari S.M., Jenkins R.C., Davies C., Tesfaye S. .Charcot neuroarthropathy in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45(8), 1085-1096.
129. Petrova N., Foster A., Edmonds M.: Difference in presentation of Charcot osteoarthropathy in Type 1 compared with Type 2 diabetes *Diab. Care* 2004; 27, 1235-1238
130. Stuck R.M., Sohn M.W., Budiman-Mak E., Lee T.A., Weiss K.B. Charcot arthropathy risk elevation in the obese diabetic population. *Am. J. Med.* 2008; 121(11), 1008-1014
131. Pinzur M. Benchmark analysis of diabetes patients with Charcot foot deformity. *Foot Ankle Int.* 1999; 20, 564-567
132. Clouse M.E., Gramm H.F., Legg M., Flood T. Diabetic osteoarthropathy: clinical and roentgenographic observation in 90 cases. *Am J Roentgenol* 1974; 121(1), 22-33.
133. Clohisy D.R., Thompson R.C. Fractures associated with neuropathic arthropathy in adults who have juvenile-onset diabetes. *J Bone Joint Surg* 1988; 70A, 1192-1200
134. Wheeler S.G., Ahroni J.H., Boyko E.J. Prospective study of autonomic neuropathy as a predictor of mortality in patients with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 58, 131-138
135. Armstrong D.G., Todd W.F., Harkless L.B. Bushman T.R. The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic. *Diabetes Med.* 1997; 14(5), 357-363
136. Brower A.C., Allman R.M. The neuropathic joint; a neurovascular bone disorder. *Radiol Clin North Am* 1981; 19, 571-580
137. Purewal T.S. Charcot's diabetic neuroarthropathy: pathogenesis, diagnosis and management. *Pract Diab Int* 1996; 13, 88-91
138. Marks R. Complication of foot ankle surgery in patient with diabetes. *Clin. Orthop.* 2001; 391, 153-156
139. Edison J., Finger D. Neurophatic osteoarthropathy of the shoulder. *J. Clin. Rheumatol.* 2005; 11, 333-334

140. Lambert A., Close C. Charcot neuroosteoarthropathy of the knee in Type 1 diabetes: treatment with total knee arthroplasty. *Diabet. Med.* 2002; 19, 338-341
141. Lambert A., Close C. Charcot neuropathy of the wrist in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28, 984-985
142. Jirkovska A., Kasalicky P., Boucek P., Hosová J., Skibová J. Calcaneal ultra sonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relation with densytometry in the lumbar spine and femoral neck and with markers of bone turnover. *Diabet. Med.* 2001; 18(6), 495-500
143. Schon L., Easley M., Weinfeld S.B. Charcot neuroarthropathy of the foot and ankle. *Clin Orthop.* 1998; 349, 116-131
144. Myerson M., Henderson M., Saxby T., Short K.W. Menagement of midfoot diabetic neuroarthropathy. *Foot Ankle Int.* 1994; 15 (5), 233-241
145. Frykberg R.G., Kozak G.R. Neuropathic arthropathy in the diabetic foot. *Am Fam Physician* 1978; 17, 105-113.
146. Game F.L., Catlow R., Jones G.R., Edmonds M.E., Jude E.B., Rayman G., Jeffcoate W.J. Audit of acute Charcot's disease in the UK: the CDUK study. *Diabetologia.* 2012; 55(1), 32-35
147. Fleischli J.E., Anderson R.B., Davis W.H. Dorsiflexion metatarsal osteotomy for treatment of recalcitrant diabetic neuropathic ulcers. *Foot Ankl Int* 1999; 20, 80-85.
148. Fishco W.D. Surgically induced Charcot's foot. *J Am Pod Med Assoc* 2001; 91, 388-393.
149. Edelman S.V., Kosofsky E.M., Paul R.A. Kozak GP. Neuroosteoarthropathy (Charcot's joint) in diabetes mellitus following revascularisation surgery. Three case reports and a review of the literature. *Arch Int Med* 1987; 147(8), 1504-1508
150. Eymontt M.J., Alavi A., Dalinka M.K., Kyle G.C. Bone scintigraphy in diabetic osteoarthropathy. *Radiology* 1981; 140, 475-477
151. Zlatkin M.B., Pathra M., Sartoris D.J ,Resnick D. The diabetic foot. *Radiol Clin North.Am* 1987; 25(6), 1095-1105.
152. Cundy T., Edmonds M.E., Watkins P.J. Osteopenia and metatarsal fractures in diabetic neuropathy. *Diabetic Med* 1985; 2, 461-464
153. Young M.J., Marshall A.B., Adams J.E. Selby P.L., Boulton A.J. Osteopenia, neurological dysfunction, and the development Charcot neuroarthropathy. *Diabetes Care* 1995; 18(1), 34-38
154. Schlossbauer T., Mioc T., Sommerey S., Kessler S.B., Reiser M.F., Pfeifer K.J. Magnetic resonance imaging in early stage Charcot

- arthropathy: correlation of imaging findings and clinical symptoms. *Eur. J. Med. Res.* 2008; 13(9), 409-414
155. Ramajunam C.L., Zgonist T. Salvage of Charcot foot neuropathy superimposed with osteomyelitis: a case report. *Journal of Wound Care* 2010; 19(11), 485-487
 156. Gill G., Hayat H., Majid S. Diagnostic delays in diabetic Charcot arthropathy. *Practical Diab. Intern.* 2004; 21, 261-262
 157. Samarasinghe Y.R., Brunton S.L., Feher M.D. Avascular necrosis not Charcot's. *Diabet Med* 2001; 18, 846-848
 158. Gill G., Benbow S., Tesfaye S., Kaczmarczyk E., Kaye L. Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J* 1997; 73, 241-242.
 159. Stevens M.J., Edmonds M.E., Foster A.V.M. Foster A.V., Watkins P.J. Selective neuropathy and preserved vascular responses in the diabetic foot. *Diabetologia* 1992; 35(2), 148-154
 160. Lesko P., Maurer R.C. Talonavicular dyslocations and midfoot arthropathy in neuropathic diabetic feet. *Clin. Orthop.* 1989; 280, 226-231.
 161. Martin M.M. Charcot joints in diabetes mellitus. *Proc R. Soc Med* 1952; 45(8), 503-506
 162. Watkins P.J., Edmonds M.E. Sympathetic nerve failure in diabetes. *Diabetologia* 1983; 25, 73-77
 163. Gupta R.A. A short history of neuropathic arthropathy. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1993; 296, 43-49
 164. Calder J.S., Holten I., McAllister R.M.R. Evidence for immune system involvement in reflex sympathetic dystrophy. *J Hand Surg* 1988; 23B, 147-150
 165. Schwarz G.S., Berenyi M.R., Siegel M.W. Atrophic arthropathy and diabetic neuritis. *Am J Roentgenol* 1969; 106, 523-529
 166. Fagius J. Microneurographic findings in diabetic polyneuropathy with special reference to sympathetic nerve activity. *Diabetologia* 1982; 23, 415-420
 167. Archer A.G., Roberts, Watkins P.J. Blood flow patterns in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1984; 27, 563-567
 168. Boulton A.J.M., Scarpello J.H.B., Ward J.D. Venous oxygen tension in diabetic neuropathic foot: evidence of arterio-venous shunting. *Diabetologia* 1981; 22, 6-8
 169. Ward J.D. The diabetic leg. *Diabetologia* 1982; 22, 141-147

170. Flynn M.D., Tooke J.E. Aetiology of diabetic foot ulceration: a role for the microcirculation? *Diabetic Med* 1992; 8, 320-329
171. Shapiro S.A., Stansberry K.B., Hill M.A. Meyer M.D., McNitt P.M., Bhatt B.A., Vinik A.I. Normal blood flow response and vasomotion in the diabetic Charcot foot. *J. Diab. Complic.* 1998; 12(12), 147-153
172. Veves A., Akbari C.M., Primavera J., Donaghue V.M., Zacharoulis D., Chrzan J.S., DeGirolami U., LoGerfo F.W., Freeman R. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease and foot ulceration. *Diabetes*. 1998; 47(3), 457-463.
173. Baker N., Green A., Krishnan S., Donaghue V.M., Zacharoulis D., Chrzan J.S., DeGirolami U., LoGerfo F.W., Freeman R. Microvascular and C-fibre function in diabetic Charcot neuroarthropathy and diabetic peripheral neuropathy. *Diab Care* 2007; 30(12), 3077-3079
174. Jeffcoate W.J. Abnormalities of vasomotor regulation in the pathogenesis of the acute Charcot foot of diabetes mellitus. *Int J Low Extrem Wounds* 2005; 4, 133-137
175. Kayath M.J., Dib S.A., Viela J.G. Prevalence and magnitude of osteopenia associated with insulin- dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Compl* 1994; 8, 97-104
176. Forst T., Pfutzner A., Kann P., Schehler B., Lobmann R., Schäfer H., Andreas J., Bockisch A., Beyer J. Peripheral osteopenia in adult patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1995; 12(10), 874-879.
177. Rix M., Andreasson H., Eskilden R. Impact of peripheral neuropathy on bone density in patients with type 1 diabetes. *Diab Care* 1999; 22, 827-831
178. Ziegler R. Diabetes mellitus and bone metabolism. *Horm Metab Res Suppl* 1992; 26, 90-94
179. Alexopoulou O., Jamart J., Devogelaer J.P., Brichard S., de Nayer P., Buysschaert M. Bone density and markers of bone remodelling in type I male diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006; 32(5Pt1), 453-458
180. Bronsky J., Prsa R., Nevoral J. The role of amylin and related peptides in osteoporosis. *Clin Chim Acta* 2006; 379, 9-16
181. Galluzzi F., Stagi S., Salti R., Toni S., Piscitelli E., Simonini G., Falcini F., Chiarelli F. Osteoprotegerin serum levels in children with type I diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(6), 879-885.

182. Petrova N., Foster A.V., Edmunds M.E. Calcaneal bone mineral density in patients with Charcot neuropathic osteoarthropathy: differences in Type1 and Type2 diabetes. *Diabet. Med.* 2005; 22, 756-761
183. Jeffcoate W.J, Game F., Cavanah P.R. The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes. *Lancet* 2005; 366, 2058-2061
184. Baumhauer J.F., O'Keefe R.J., Schon L.C. Mason R., Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Hofbauer L.C., Adler G., Kratzer W., Reinshagen M. Cytokine induced osteoclastic bone resorption in Charcot arthropathy: an immunohistochemical study. *Foot Ankle Int.* 2006; 27(10), 797-800
185. Petrova N.L., Moniz C., Elias D.A. Buxton-Thomas M., Bates M., Edmunds M.E. Is there a systemic inflammatory response in the acute Charcot foot? *Diabetes Care* 2007; 30, 997-998
186. Herbst S., Jones K.C., Saltzman C.L. Pattern of diabetic neuropathic arthropathy associated with the peripheral bone mineral density. *J. Bone Joint Surg.* 2004; 86(3), 378-83
187. Sugawara J., Hayashi K., Yamada H., Kizuka T., Tanaka H. Reductions in basal limb blood flow and lumen diameter after short term leg casting. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004; 36(10), 1689-1694
188. Jeffcoate W. Vascular calcification and osteolysis in diabetic neuropathy – is RANK-L the missing link? *Diabetologia* 2004; 47, 1488-1492
189. Yasuda H., Shima N., Nagakawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin /osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1998; 95(7), 3597-3602
190. Khosla S. Minireview: The OPG/ RANKL/ RANK system. *Endocrinology* 2001; 142 (12), 5050-5055
191. Saggese G., Baroncelli G., Bertelloni S. Osteoporosis in children and adolescents : diagnosis, risk factors, and prevention. *Jour. Ped. Endocrin. Metab.* 2001; 14(7), 833-859
192. Arron J.R., Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408, 535-536
193. Czerwiński E., Osieleniec J., Badurski J. Współczesna diagnostyka osteoporozy. *Family Medicine & Primary Care*, 2008, 821-829

194. Vaananen H.K., Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure *Jour. of Cell Sci.* 1995; 108(8), 2729-2732
195. Frost H.M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. *Anatomical Record* 1990; 226 (4), 403-413
196. Frost H.M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU):2 Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anatomical Record* 1990; 226 (4), 414-422
197. Geusens P., Dequeker J., Verstraeten A., Nijs J. Age-, sex-, and menopause –related changes of vertebral and peripheral bone: Population study using dual and single photon absorptiometry and radiogrammetry. *Jour. Nucl. Med.* 1986; 27(10), 1540-1549
198. Rodan G.A., Martin T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. *Calif. Tissue Int.* 1981; 33, 349-351
199. Takahashi N., Akatsu T., Udagawa N., Sasaki T., Yamaguchi A., Moseley J.M., Martin T.J., Suda T.B. Osteoblastic cells are involved in osteoclasts formation *Endocrinology* 1988; 123(5), 2600-2602
200. Liu B., Guo J., Lanske B., Divieti P., Kronenberg H.M., Bringham F.R. Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone –dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139(4), 1952-1964
201. Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T., Martin T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families *Endocr. Rev.* 1999; 20(3), 345-357
202. Takeda S., Yoshizawa T., Nagai Y., Yamato H., Fukumoto S., Sekine K., Kato S., Matsumoto T., Fujita T. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxy vitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 1999; 140(2), 1005-1008
203. Vega D., Maalouf N.M., Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK Ligand/ Osteoprotegerin: clinical implications. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2007; 92(12), 4514-4521
204. Eriksen E.F., Colvard D.S., Berg N.J., Graham M.L., Mann K.G., Spelsberg T.C., Riggs B.L. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblasts-like cells. *Science* 1988; 241(4861), 84-86
205. Suva L.J., Winslow G.A., Wettenhall R.E., Hammonds R.G., Moseley J.M., Diefenbach-Jagger H., Rodda C.P., Kemp B.E., Rodriguez H., Chen E.Y. A parathormone-related protein implicated in malignant

- hypercalcemia cloning and expression. *Science*, 1987; 237(4817), 893-896
206. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism an implication for the pathogenesis and treatment of osteoporosis *Endocr. Rev.* 2000; 21, 115-137
 207. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organization – Technical Report Series. 1994; 843, 1-129
 208. Pietrapertosa A.C., Minenna G., Colella S.M., Santeramo T.M., Renni R., D'Amore M. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of osteoporosis in patients with thalassaemia major. *Panminerva Med.* 2009; 51(1), 17-23.
 209. Sasaki N., Kusano E., Ando J., Nemoto J., Imura O., Ito C., Takeda S., Yano K., Tsuda E., Asano Y. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. *Bone* 2002; 30(6), 853-858
 210. v.Triptiz C., Epp S., Klaus J., Mason R., Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Hofbauer L.C., Adler G., Kratzer W., Reinshagen M. Effect of systemic glucocorticoid therapy on bone metabolism and the osteoprotegerin system in patients with active Crohn disease. *Eur. Gastroenterol. Hepatol* 2003; 15(11), 1165-1170
 211. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003; 15(4), 454-457
 212. Faienza M.F., Brunetti G., Colucci S., Piacente L., Ciccarelli M., Giordani L., Del Vecchio G.C., D'Amore M., Albanese L., Cavallo L., Grano M. Osteoclastogenesis in children with 21-hydroxylase deficiency on long-term glucocorticoid therapy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin imbalance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(7), 2269-2276.
 213. Giuliani N., Colla S., Sala R., Lazzaretti M., La Monica S., Bonomini S., Hojden M., Sammarelli G., Barillè S., Bataille R., Rizzoli V. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* 2002; 100(13), 4615-4621
 214. Giuliani N., Bataille R., Mancini C., Lazzaretti M., Barillè S. Myeloma cells induced imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, 2001; 98(13), 3527-3533
 215. Jakob C., Goerke A., Terpos E., Sterz J., Heider U., Kühnhardt D., Ziefle S., Kleeberg L., Mieth M., Metzler Iv., Müller C., Sezer O.

- Serum levels of total-RANKL in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma*. 2009; 9(6), 430-5
216. Jones D.H., Nakshima T., Sanchez O.H., Kozieradzki I., Komarova S.V., Sarosi I., Morony S., Rubin E., Sarao R., Hojilla C.V., Komnenovic V., Kong Y.Y., Schreiber M., Dixon S.J., Sims S.M., Khokha R., Wada T., Penninger J.M. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006; 440(7086), 692-696
217. Ito R., Nakayama H., Yoshida K., Kuraoka K., Motoshita J., Oda N., Oue N., Yasui W. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Arch*. 2003; 443(2), 146-151
218. Stanisławowski M., Kmieć Z. The participation of RANK, RANKL and OPG in tumor osteolysis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009; 15(63), 234-241
219. Ziółkowska M., Kurowska M., Radzikowska A., Luszczykiewicz G., Wiland P., Dziewczopolski W., Filipowicz-Sosnowska A., Pazdur J., Szechinski J., Kowalczewski J., Rell-Bakalarska M., Maslinski W. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis Rheum* 2002; 46(7), 1744-1753
220. Haynes D.R., Crotti T.N. Regulation of bone lysis in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2003; 11(4), 323-331.
221. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423, 337-342
222. Bierhaus A., Schiekofler S., Schwaninger M., Andrassy M., Humpert P.M., Chen J., Hong M., Luther T., Henle T., Klötting I., Morcos M., Hofmann M., Tritschler H., Weigle B., Kasper M., Smith M., Perry G., Schmidt A.M., Stern D.M., Häring H.U., Schleicher E., Nawroth P.P. Diabetes associated sustained activation of the transcription factor nuclear κ B. *Diabetes* 2001; 50(12), 2792-2808
223. Aljada A., Ghanim H., Saadeh R. Insulin inhibits NF- κ B and MCP-1 expression in human endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86, 450-453
224. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Lüthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W.J. Osteoprotegerin: a novel

- secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2), 309-319
225. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M, Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139(3), 1329-1337
 226. Lories R.J.U., Luyten F.P. Osteoprotegerin and osteoprotegerin-ligand balance: a new paradigm in bone metabolism providing new therapeutic targets. *Clin. Rheumatol.* 2001; 20, 16-21
 227. Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M., Lee J.C., Young P.R. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Jour. Biol. Chem.* 1998; 273(23), 14363-7
 228. Venuraju S.M., Yerramasu A., Corder R. Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(19), 2049-2061
 229. O'Sullivan E.P., Ashley D.T., Davenport C., Devlin N., Crowley R., Agha A., Thompson C.J., O'Gorman D., Smith D. Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res Rev.* 2011; 26(6), 496-502
 230. Reid P., Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol.* 2009; 88(1), 1-17
 231. Kostenuik P.J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol.* 2005; 5(6), 618-625
 232. Schett G., Redlich K., Hayer S., Zwerina J., Bolon B., Dunstan C., Görtz B., Schulz A., Bergmeister H., Kollias G., Steiner G., Smolen J.S. Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(7), 2042-2051
 233. Jørgensen L., Vik A., Emaus N., Brox J., Hansen J.B., Mathiesen E., Vestergaard P. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand: the Tromsø Study. *Osteoporos Int.* 2010; 21(6), 931-938.
 234. Stajszczyk M. Rola receptora aktywnego czynnika jądrowego kB (RANK), jego ligandu (RANK-L) i osteoprotegeryny (OPG) w metabolizmie kości. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2002; 3(9), 916-922

-
235. Wright H.L., McCarthy H.S., Middleton J., Marshall M. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskel Jet Med.* 2009; 2(1), 56-64.
 236. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S., Yano K., Kobayashi F., Morinaga T., Higashio K Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Bioch. Bioph. Communic.* 1997; 234(1), 137-142
 237. Yamaguchi K., Kinoshita M., Goto M. Characterization of structural Domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 5117-5123
 238. Lacey D.L., Tan H.L., Lu J., Van G., Qiu W., Rattan A., Scully S., Fletcher F., Juan T., Kelley M., Burgess T.L., Boyle W.J., Polverino A.J. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival invitro and in vivo. *Amer. Jour. Pathol.* 2000; 157 (2), 435-438
 239. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification *Genes. Dev.* 1998; 12(9), 1260-1268
 240. Pedersen E.R., Ueland T., Seifert R., Aukrust P., Schartum-Hansen H., Ebbing M., Bleie Ø., Igland J., Svingen G., Nordrehaug J.E., Nygård O. Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 2010; 212(2), 644-649
 241. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and Osteoprotegerin. *Circ. Res.* 2004; 95(11), 1046-1057
 242. Theill L.E., Boyle W.J., Penniger J.M. Rankl and RANK T-cells, bone loss, and mammalian evolution *Ann. Rev. Immunol.* 2002; 20, 795-823
 243. Szulc P., Hofbauer L.C., Heufelder A.E., Roth S., Delmas P.D. Osteoprotegerin serum levels in men : Correlation with age, estrogen, and testosterone status. *Jour. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(7), 3162-3165
 244. Khosla S., Arrighi H.M., Melton L.J., Atkinson E.J., O'Fallon W.M., Dunstan C., Riggs Bet. Correlates of Osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporosis Int.* 2002; 87(10), 4470-4475
 245. Rogers A., Saleh G., Hannon R.A. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *Jour. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(10), 4470-4475

246. Kudlacek S., Schneider B., Woloszczuk W., Pietschmann P., Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*. 2003; 32(6), 681-686.
247. Indridason O.S., Franzson L., Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporosis Intern*. 2005; 16(4), 417-423
248. Yano K., Tsuda E., Washida N., Kobayashi F., Goto M., Harada A., Ikeda K., Higashio K., Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/ osteoclastogenesis inhibitory factor increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Jour. Bone Mineral. Research* 1999; 14(4), 518-527
249. Arrighi H.M., Khosla S., Melton L.J. The relationship between circulating osteoprotegerin and estrogen in postmenopausal women *Jour .Bone Mineral Research*. 2000; 15, (suppl 1), M 344
250. Hofbauer L.C., Schoppet M. Serum measurement of osteoprotegerin – clinical relevance and potential applications. *Eur J of Endocrinol* 2001; 145(6), 681-683
251. Rogers A., Eastell R. Review: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *Jour. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005; 90(11), 6323-6331
252. Andersen G.O., Knudsen E.C., Aukrust P., Yndestad A., Oie E., Müller C., Seljeflot I., Ueland T. Elevated serum osteoprotegerin levels measured early after acute ST-elevation myocardial infarction predict infarct size. *Heart*, 2011; 97 (6), 460-465
253. Schett G., Kiechl S., Redlich K., Oberhollenzer F., Weger S., Egger G., Mayr A., Jocher J., Xu Q., Pietschmann P., Teitelbaum S., Smolen J., Willeit J. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA* 2004; 291(9), 1108-1113
254. Anderson D.M., Maraskowsky E., Billingsley W.L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic – cell function *Nature* 1997; 390, 175-179
255. Ikeda T., Kasai M., Utsuyama M., Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142 (4), 1419-1426
256. Hofbauer L.C, Schoppet M. Osteoprotegerin a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet*, 2001; 358, 257-259
257. Whong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y. TRANCE (Tumor necrosis factor TNF-related activation induced cytokine) a new TNF family member predominantly ex-

- pressed in T cells is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* 1997; 186(12), 2075-2080
258. Imai S., Matsusue Y. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene related peptide-, substance P, and tyrosine hydroxylase containing nerves and the bone. *Microsc Res Tech.* 2002; 58, 61-69
259. Kostenuik P.J., Shalhoub V.: Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 2001; 7(8), 613-635
260. Buckley K.A., Fraser W.D. Receptor activator for nucleus faktor kappa B ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses potential therapeutic agents and biochemical markers *Ann. Clin. Biochem.* 2002; 39, 551-556
261. Mosheimer B.A., Kaneider N.C, Feistritzer C., Storn D.H., Wiedermann C.J. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis and Rheumatism* 2004; 50(7), 2309-2316
262. Kong Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H.L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A.J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C.R., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J., Penninger J.M. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphnode organogenesis. *Nature* 1999; 397, 315-323
263. Mabileau G., Petrova N.L., Edmonds M.E. Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Diabetologia* 2008; 51, 1035-1040
264. Blazquez-Medela A., Garcia-Ortiz L., Gomez-Marcos M.A., Recio-Rodriguez J.I., Sánchez-Rodríguez A., López-Novoa J.M., Martínez-Salgado C. Osteoprotegerin is associated with cardiovascular risk in hypertension and / or diabetes. *European Journal of Clinical Investigation* 2012; 42(5), 548-556
265. Xiang G.D., Sun H.L., Zhao L.S. Changes of osteoprotegerin before and after insulin therapy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007; 76(2), 199-206
266. Terekeci H.M., Senol M.G., Top C., Sahan B., Celik S., Sayan O., Kucukardali Y., Ipcioglu O., Cagiltay E., Oktenli C., Ozata M. Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009; 117(3), 119-23
267. Browner W.S., Lui L.Y., Cummings S.R. Associations of serum osteoprotegerin level with diabetes, stroke, bone density, fractures and

- mortality in elderly women *J. Clin Endocrinol. Metab.* 2001; 86(2), 631-637
268. Rasmussen L.M., Tarnow L., Hansen T.K., Parving H.H., Flyvbjerg A. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status systolic blood pressure, kidney function, cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur. J. Endocrinol.* 2006; 154, 75-81
269. Schoppet M., Sattler A.M., Schaefer J.M., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C. Increased serum levels in men with coronary artery disease *J.Clin Endocrinol.Metab* 2003; 88(8), 1024-1028
270. Avignon A., Sultan A., Piot C., Elaerts S., Cristol J.P., Dupuy A.M. Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high risk but asymptomatic type 2 diabetes patients. *Diabetes Care* 2005; 28(9), 2176-2180
271. Chen N.X., Moe S.M. Arterial calcification in diabetes *Curr. Diab. Rep.* 2003; 3, 28-32
272. Kaden J.J., Bickelhaupt S., Grabholz Z.R, Haase K.K., Sarikoç A., Kiliç R., Brueckmann M., Lang S., Zahn I., Vahl C., Hagl S., Dempfle C.E., Borggreffe M. Receptor activator of nucleus factor kappa B ligand and osteoprotogerin regulate aortic valve calcification. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 36(1), 56-66
273. Christensen T.M., Simonsen L., Holstein P.E., Svendsen O.L., Bülow J. Sympathetic neuropathy in diabetes mellitus patients does not elicit Charcot osteoarthropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2011; 25(5), 320-324
274. Chantelau E., Onvlee G.J. Charcot foot in diabetes farewell to the neurophatic theory. *Horm. Metab. Res.* 2006; 38(6), 361-367
275. Psyrogiannis A., Kyriazopoulou V., Vegenakis A.G. Medial arterial calcyfication in frequently found in patients with microalbuminuria. *Angiology* 1999; 50(12), 971-975
276. Gentile S., Bizarro A., Marmo R, de Bellis A., Orlando C. Medial arterial calcification in diabetes neuropathy *Acta. Diabetol. Lat.* 1990; 27(30), 243-253
277. Edmonds M.E., Morrison N., Laws J.W., Watkins P.J. Medial arterial calcification in diabetes neuropathy. *Br. Med. J.(Clin. Res. Ed.)* 1982; 284, 928-930
278. Goebel F.D., Füessl H.S. Mönckebergs sclerosis after sympathetic denervation in diabetic and nondiabetic subject. *Diabetologia* 1983; 24, 347-350

-
279. Mayfield J.A., Caps M.T., Boyko E.J. Relationship of medial arterial calcinosis to autonomic neuropathy and adverse outcomes in a diabetic veteran population. *J. Diabetes Complications*, 2002;16, 165-171
280. Jeffcoate W.J., Rassmussen L.M., Hofbauer L.C., Game F.L. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia* 2009; 52, 2478-2488
281. Hofbauer L.C., Brueck C.C., Shanahan C.M., Schoppet M., Dobnig H. Vascular calcification and osteoporosis from clinical observations to towards molecular understanding. *Osteoporosis Int.* 2007; 18(3), 251-259
282. Satler A.M., Schappet M., Schaefer J.R., Hofbauer L.C. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif. Tissue Int.* 2004; 74(1), 103-106
283. Ueland T., Yndestad A., Qie E., Florholmen G., Halvorsen B., Frøland S.S., Simonsen S., Christensen G., Gullestad L., Aukrust P. Dysregulated osteoprotegerin /RANK Ligand /RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation* 2005; 111(19), 2461-2468
284. Ueland T., Dahl C.P., Kiekshus J., Hulthe J., Böhm M., Mach F., Goudev A., Lindberg M., Wikstrand J., Aukrust P., Gullestad L. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure. Results from CORONA. *Circ. Heart Fail.* 2011; 4, 145-152
285. Grigoropoulou P., Eleftheriadou I.Z., Tentolorius N. The role OPG/RANKL/RANK system in diabetic vascular disease *Curr. Med. Chem.* 2011; 18(31), 4813-4819
286. Mesquita M., Demulder A., Damry N., Mélot C., Wittersheim E., Willems D., Dratwa M., Bergmann P. Plasma osteoprotegerin is an independent risk factor for mortality and an early biomarker of coronary vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47(3), 339-346
287. Semb A.G., Ueland T., Aukrust P., Wareham N.J., Luben R., Gullestad L., Kastelein J.J., Khaw K.T., Boekholdt S.M. Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29(6), 975-80.
288. Vik A., Mathiensen E.B., Brox J., Wilsgaard T., Njølstad I., Jørgensen L., Hansen J.B. Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population - The Tromsø Study. *J Thromb Haemost* 2011; 9(4), 638-44

289. Roysland R., Masson S., Omland T. Prognostic value of osteoprotegerin in chronic heart failure. The GISSI-HF trial. *Am. Heart J.* 2010; 160(2), 286-293
290. Niskanen L., Sitonen O., Suhonen M., Uusitupa M.I. Medial artery calcification predicts cardiovascular mortality in patients with NDDM. *Diabetes Care* 1994; 17(11), 1252-1256
291. Morena M., Dupuy A.M., Jaussent I., Vernhet H., Gahide G., Klouche K., Bargnoux A.S., Delcourt C., Canaud B., Cristol J.P. A cut-off value of plasma osteoprotegerin level may predict the presence of coronary artery calcifications in chronic kidney disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24(11), 3389-3397
292. Costacou T., Huskey N.D., Edmuntowicz D., Stolk R., Orchard T.J. Lower extremity arterial calcification as a correlate of coronary artery calcification. *Metabolism* 2006; 55(12), 1689-1693
293. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Weissberg P.L. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro. *Circ. Res.* 2000; 87(11), 1055-1062
294. Pitocco D., Zelano G., Gioffre D., Di Stasio E., Zaccardi F., Martini F., Musella T., Scavone G., Galli M., Caputo S., Mancini L., Ghirlanda G. Association between osteoprotegerin G1181C and T 245G polymorphisms and diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabetes Care* 2009; 32(9), 1694-1697
295. Wuyts W., Wesenbeeck F., Morales-Piga A., Ralston S., Hocking L., Vanhoenacker F., Westhovens R., Verbruggen L., Anderson D., Hughes A., Van Hul W. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone. *Bone* 2001; 28(1), 104-107
296. Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L., Eriksen E.F. Polymorphisms in the Osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.* 2002; 17(7), 1245-1255
297. Seremak-Mrozikiewicz A., Tatuśko J., Drews K., Barlik M., Krajewski P., Spaczyński M., Mrozikiewicz P.M. Polimorfizm genu kodującego osteoprotegerynę a występowanie osteoporozy u kobiet po menopauzie. *Ginekol. Pol.* 2009; 80(5), 354-360
298. Roshandel D., Holliday K.L., Pye S.R., Boonen S., Borghs H., Vanderschueren D., Huhtaniemi I.T., Adams J.E., Ward K.A., Bartfai G., Casanueva F.F., Finn J.D., Forti G., Giwercman A., Han T.S., Kula K., Lean M.E., Pendleton N., Punab M., Wu F.C., Holliday K.L., O'Neill T.W. EMAS Study Groupet: Genetic variation in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway is associated in bone turnover and bone mineral density in men. *J. Bone Miner. Res.* 2010; 25(8), 1830-1838

299. Brändström H, Gerdhem P, Stiger F, Obrant KJ, Melhus H, Ljunggren O, Kindmark A, Akesson K. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74(1):18-24
300. Lee Y.H, WooJ.H, Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density a metaanalysis. *Mol. Biol. Rep.* 2010; 37(1), 227-234
301. Dong S., Liu X.G., Chen Y., Guo Y., Wang L., Zhao J., Xiong D.H., Xu X.H., Recker R.R., Deng H.W. Association Analyses of RANKL/RANK/OPG Gene Polymorphisms with Femoral Neck Compression Strength Index Variation in Caucasians. *Calcif. Tissue Int.* 2009; 85(2), 104-112
302. Pennisi P., Signorelli S.S., Riccobene S., Celotta G., Di Pino L., La Malfa T., Fiore C.E. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels. *Osteop. Int.* 2004; 15(5), 389-395
303. Schoppet M., Preissner K.T., Hoffbauer L.C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22(4), 549-553
304. Ueland T., Jemtland R., Godang K., Kjekshus J., Hognestad A., Omland T., Squire I.B., Gullestad L., Bollerslev J., Dickstein K., Aukrust P. Prognostic value of osteoprotegerin in heart failure after acute myocardial infarction. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 2004; 44(10), 1970-1976
305. Jono S., Ikari Y., Shioi A., Mori K., Miki T., Hara K., Nishizawa Y. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106(10), 1192-1194
306. Soufi M., Schoppet M., Sattler A.M., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C., Schaefer J.R. Osteoprotegerin gene polymorphism in men with coronary artery disease. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2004; 89(8), 3764-3768
307. Ueland T., Wilson S.G., Amirul Islam F.M., Mullin B., Devine A., Bollerslev J., Zhu K., Prince R.L. A cohort study of the effects of serum osteoprotegerin and osteoprotegerin gene polymorphisms on cardiovascular mortality in elderly women. *Clin. Endocrinol* 2009; 71(6), 828-833
308. Rhee E.J., Oh K.W., Jung C.H., Lee W.Y., Oh E.S., Yun E.J., Baek K.H., Kang M.I., Kim S.W. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin

- gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. *Clin Endocrinol.* 2006; 64(6), 689-697
309. Korzon-Burakowska A., Jakóbkiewicz-Banecka J., Fiedosiuk A., Petrova N., Koblik T., Gabig-Cimińska M., Edmonds M., Małecki M.T., Węgrzyn G. Osteoprotegerin gene polymorphism in diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabet. Med.* 2012; 29(6), 771-775
310. Armstrong D.G., Todd W.F., Lavery L.A., Harkless L.B., Bushman T.R. The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic. *J Am Podiatr Med Assoc.* 1997; 87(6) 272-278
311. Caputo G.M., Ulbrecht J., Cavanagh P.R., Juliano P. The Charcot foot in diabetes: six key points. *Am. Fam. Physician.* 1998; 57(11): 2705-2710
312. Eneroth M., Apelqvist J., Stenstrom A. Clinical characteristics and outcome in 223 diabetic patients with deep foot infections. *Foot Ankle Int.* 1997; 18(11), 716-22
313. Frykberg R.G., Eneroth M. Principles of conservative management. In *The Diabetic Charcot Foot: Principles and Management.* Frykberg RG, Ed. Brooklandville, MD, Data Trace Publishing Company. 2010; 93-116
314. Classen J.N., Rolley R.T., Carneiro R., Martire J.R. Management of foot conditions of the diabetic patient. *Am Surg.* 1976; 42(2), 81-8
315. Pinzur M.S., LioT., Posner M. Treatment of Eichenholtz stage I Charcot foot arthropathy with a weightbearing total contact cast. *Foot Ankle Int* 2006; 27(5), 324-329
316. Dhalla R., Johnson J.E., Engsborg J. Can the use of a terminal device augment plantar pressure reduction with a total contact cast? *Foot Ankle Int.* 2003; 24(6), 500-505
317. Nabuurs-Franssen M.H., Slegers, R., Huijberts M.S.P. Total Contact casting of the diabetic foot in daily practice: A prospective follow up study. *Diabetes Care.* 2005; 28(2), 243-247
318. McCrory J.L., Morag E., Norkitis A. Healing of Charcot fractures: skin temperature and radiographic correlates. *The Foot* 1998; 8, 158-165
319. McGill M., Molyneaux L., Bolton T., Ioannou K., Uren R., Yue D.K. Response of Charcot's arthropathy to contact casting: assesement by quantitative techniques. *Diabetologia* 2000; 43(4), 481-484
320. Tovey F.I. The manufacture of diabetic footwear *Diabet. Med.* 1984; 1(1), 69-71
321. Caravaggi C.M., Sganzeroli A.B., Galenda P., Balaudo M., Gherardi P., Simonetti D., Ferraresi R., Farnetti A., Morandi A. Long-term follow-up of tibiocalcaneal arthrodesis in diabetic patients with early

- chronic Charcot osteoarthropathy. *J Foot Ankle Surg.* 2012; 51(4), 408-411
322. Jude E.B., Selby P.L., Burgess J., Lilleystone P., Mawer E.B., Page S.R., Donohoe M., Foster A.V., Edmonds M.E., Boulton A.J. Biphosphonates In the treatment of Charcot neuroarthropathy a double blind randomised controlled trial. *Diabetologia* 2001; 44(11), 2032-2037
323. Anderson J.J., Woelffer K.E., Holtzman J.J., Jacobs A.M. Biphosphonates for the treatmentof Charcot neuroarthropathy. *J. Foot Ankle Surg* 2004; 43(5), 285-289
324. Pitocco D., Ruotolo V., Caputo S., Mancini L., Collina C.M., Manto A., Caradonna P., Ghirlanda G. Six month treatment with alendronate in acute Charcot neuroarthropathy. *Diabetes Care* 2005; 28(5), 1214-1215
325. Pakarinen T.K., Laine HJ, Mäenpää H., Mattila P., Lahtela J. The effect of zoledronic acid on the clinical resolution of Charcot neuroarthropathy: a pilot randomized controlled trial. *Diabetes Care.* 2011; 34(7), 1514-1516
326. Bem R., Jirkovska A., Fejfarova V., Skibová J., Jude E.B. Intranasal calcitonin in the treatmentof acute Charcot neuroarthropathy a randomized controlled trial. *Diabetes Care,* 2006; 29(6), 1392-1394
327. Favus M.J. Does denosumab improve low BMD in postmenopausal women? *Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2006; 2(11), 600-601
328. Charopoulos I., Orme S., Glannoudis P.V. The role and efficacy of denosumab in the treatment of osteoporosis an update. *Expert Opin Drug Saf.* 2011; 10(2), 205-217
329. Silva-Fernández L., Rosario M.P., Martínez-López J.A., Carmona L., Loza E. Denosumab for the treatment of osteoporosis: a systemic literature review. *Reumatol Clin.* 2013; 9(1):42-52
330. Cummings S.R., San Martin J., McClung M.R, Siris E.S., Eastell R., Reid I.R., Delmas P., Zoog H.B., Austin M., Wang A., Kutilek S., Adami S., Zanchetta J., Libanati C., Siddhanti S., Christiansen C. FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. Med.* 2009; 361(8), 756-765
331. Simonelli C. Denosumab: do we need another of the same? *Am Fam Physician.* 2012; 86(11), 992-994.
332. Ahmed I. Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: Analysis from the FREEDOM trial. *Int J Clin Pract.* 2012; 66(12), 1129-1131

333. Brown J.P., Roux C., Törring O., Ho P.R., Beck-Jensen J.E., Gilchrist N., Recknor C., Austin M., Wang A., Grauer A., Wagman R.B. Discontinuation of denosumab and associated fracture incidence: Analysis from the FREEDOM Trial. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(4):746-52
334. Bachman M.F., Wong B.R., Josien R., Steinman R.M., Oxenius A., Choi Y. TRANCE a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.* 1999; 189(7), 1025-1031
335. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2010. *Diabetologia Praktyczna 2010*, tom 11, supl. A.
336. Apelqvist J., Bakker K., van Houtum W.H., Schaper N.C. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2008; 24, 181-187
337. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę *Diabetologia Kliniczna 2012*, tom 1, supl. A
338. Young M.J., Breddy J.L., Veves A., Boulton A.J. The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds. A prospective study. *Diabetes Care.* 1994;17, 557-560.
339. Ziegler D., Mayer P., Gries F.A. Evaluation of thermal, pain, and vibration sensation thresholds in newly diagnosed type 1 diabetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988; 51, 1420-1424.
340. Standards of Medical Care in Diabetes 2008. Position Statement American Diabetes Association *Diabetes Care* 2008; Suppl.1,12-S54
341. Young M.J., Boulton A.J., MacLeod A.F. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population *Diabetologia.* 1993; 36(2), 150-154
342. Boulton AJM. The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis, *Proceedings of the fifth international symposium on the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24(Suppl 1): S3-S5
343. Larsson J, Agardh CD, Apelqvist J, Stenström A. Long-term prognosis after healed amputation in patients with diabetes. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 350: 149-158.
344. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures, 2000*
345. Gough A, Abraham H, Li F, Purewal TS, Foster AV, Watkins PJ, Moniz C, Edmonds ME. Measurement of markers of osteoclast and osteoblast activity in patients with acute and chronic diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabet Med* 1997; 14(7): 527-531
346. Uccioli L, Sinistro A, Almerighi C, Ciaprini C, Cavazza A, Giurato L, Ruoto-lo V, Spasaro F, Vainieri E, Rocchi G, Bergamini A. Proinflammatory modulation of the surface and cytokine phenotype of

- monocytes in patients with acute Charcot foot. *Diabetes Care* 2010; 33(2) 350-355.
347. Daroszevska A, Hocking LJ, McGuigan FE et al. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1506–1511.
348. Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, Epplen JT, Kekow J, Roemer K, Wiczorek S. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *J Rheumatol* 2010; 37(5): 900-4.
349. Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2006; 20; 53(4): 386-395.
350. Moffett SP, Oakley JI, Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Taylor BC, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G, Cummings SR, Zmuda JM; Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoprotegerin Lys3Asn Polymorphism and the Risk of Fracture in Older Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(5): 2002–2008.
351. Ueland T, Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Mullin BH, Devine A, Prince RL. No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone* 2007; 40(1):175–181.
352. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14(5): 913-918.
353. Mencej S, Prezelj J, Kocijancic A, Ostanek B, Marc J. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in post-menopausal women. *Maturitas* 2006; 55(3): 219-226.
354. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HAP, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas F, Uitterlinden AG, Spector TD. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008; 371(9623): 1505–1512.
355. Richards JB, Kavvoura FT, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Mullin BH, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Hofman A,

- Kong A, Karasik D, van Meurs JB, Oostra BA, Pols HAP, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Soranzo N, Williams FMK, Zhou Y, Ralston SH, Thorleifsson G, van Duijn CM, Kiel DP, Stefansson K, Uitterlinden AG, Ioannidis JPA, Spector TD for the GEFOS (Genetic Factors for Osteoporosis) Consortium Collaborative Meta-analysis. Associations of 150 Candidate Genes With Osteoporosis and Osteoporotic Fracture. *Ann Intern Med* 2009; 151(8): 528–537.
356. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352(9131): 837–853.
357. Kimmerle R, Chantelau E. Weight-bearing intensity produces charcot deformity in injured neuropathic feet in diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115(6): 360-364.
358. Ross AJ, Mendicino RW, Catanzariti AR. Role of body mass index in acute charcot neuroarthropathy. *J Foot Ankle Surg* 2013; 52(1): 6-8.
359. Foltz KD, Fallat LM, Schwartz S. Usefulness of a brief assessment battery for early detection of Charcot foot deformity in patients with diabetes. *J Foot Ankle Surg* 2004; 43(2): 87-92.
360. Sohn MW, Lee TA, Stuck RM, Frykberg RG, Budiman-Mak E. Mortality risk of Charcot arthropathy compared with that of diabetic foot ulcer and diabetes alone. *Diabetes Care*. 2009; 32(5): 816-821.
361. Thompson RC Jr, Havel P, Goetz F. Presumed neurotrophic skeletal disease in diabetic kidney transplant recipients. *JAMA* 1983; 249(10): 1317-1319.
362. Valabhji J, Marshall RC, Lyons S. et al. Asymmetrical attenuation of vibration sensation in unilateral diabetic Charcot foot neuroarthropathy. *Diabetic Medicine* 2012; 1464-1549.
363. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(9): 4080-4084.
364. Biscetti F, Straface G, Giovannini S, Santoliquido A, Angelini F, Santoro L, Porreca CF, Pecorini G, Ghirlanda G, Flex A. Association between TNFRSF11B gene polymorphisms and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. *Hum Genet* 2013; 132(1): 49-55.
365. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int* 2002; 71(1): 26-35.

-
366. Wang C, Zhang Z, Zhang H, He JW, Gu JM, Hu WW, Hu YQ, Li M, Liu YJ, Fu WZ, Yue H, Ke YH, Zhang ZL. Susceptibility genes for osteoporotic fracture in postmenopausal Chinese women. *J Bone Miner Res* 2012; 27(12): 2582-2591.
 367. Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 51(3): 270-279.
 368. Mencej S, Albagha OM, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate pro-moter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Mol Endocrinol* 2008; 40(6): 273-9.
 369. Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007; 18(3): 323-331.
 370. Mezquita-Raya P, de la Higuera M, García DF, Alonso G, Ruiz-Requena ME, de Dios Luna J, Escobar-Jiménez F, Muñoz-Torres M. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005; 16(11): 1368-1374.
 371. Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999; 14(4): 518-527.
 372. Materiały Konferencji Diabetic Foot Study Group rok 2008 str. 32
 373. Materiały Konferencji Diabetic Foot Study Group rok 2008 str. 30
 374. Nybo M, Poulsen K, Grauslund J, Henriksen JE, Rasmussen LM. Plasma osteoprotegerin concentrations in peripheral sensory neuropathy in Type 1 and Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2010; 27(3): 289-294.

10. STRESZCZENIE

Neuropatia jest jednym z najczęściej występujących powikłań cukrzycy. U niektórych chorych z obwodową symetryczną dystalną polineuropatią dochodzi do rozwoju neuroosteoartropatii Charcota – szczególnego zajęcia procesem chorobowym układu kostnego stopy, powodującego całkowitą destrukcję tkanki kostnej, dezorganizację stawów oraz aparatu więzadłowego. Nasiloną deformacja kończyny, będąca skutkiem neuroosteoartropatii, w połączeniu z zanikiem czucia bólu jest przyczyną powstawania owrzodzeń, infekcji i w bardzo wielu przypadkach prowadzi do konieczności amputacji kończyny. Ostra faza neuroosteoartropatii manifestuje się triadą objawów pod postacią obrzęku, zaczerwienienia, wzrostu ucieplenia zajętej stopy. Utrzymujące się zapalenie prowadzi do nasilonej osteopenii, uszkodzeń i złamań, subluksacji, dyslokacji elementów szkieletu stopy. Na skutek braku jasnych, klinicznych i radiologicznych, kryteriów diagnostycznych oraz obrazu klinicznego mogącego sugerować między innymi bakteryjny stan zapalny, wiele przypadków neuroosteoartropatii Charcota pozostaje przez dłuższy czas nierozpoznanych lub rozpoznanie jest opóźnione. Sprzyja temu brak markerów laboratoryjnych pozwalających potwierdzić rozpoznanie neuroosteoartropatii w jej ostrej fazie, nie ma również możliwości określenia, u których pacjentów z neuropatią istnieje podwyższone ryzyko rozwoju tego powikłania. Przyczyny postawania stopy Charcota są niejasne. Na początku XXI wieku pojawiły się doniesienia, na podstawie których sformułowano tzw. „teorię zapalną”, która przywiązuje dużą rolę patogenetyczną do toczącego się miejscowo procesu zapalnego (towarzyszącego procesowi gojenia mikrozłamań, do których dochodzi w przebiegu neuroosteoartropatii) i nasilonego wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-1 β , TNF- α i inne. Wydzielane cytokiny prozapalne prowadzą do wzrostu aktywności niedawno wykrytego szlaku metabolicznego, którego elementami są osteoprotegeryna OPG (*osteoprotegerin*), receptor aktywujący jądrowy czynnik kappa B – RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*) oraz ligand dla RANK – RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand*). RANKL bierze udział w większości schorzeń przebiegających z osteolizą, a zaburzenie wzajemnego stosunku OPG/RANKL może być również odpowiedzialne za osteopenię w przebiegu neuroosteoartropatii. Jest to tym bardziej prawdopodobne że ten sam system cytokin odpowiada za obserwowaną, zwłaszcza w przebiegu neuroosteoartropatii, kalcyfikację naczyń. Do niewyjaśnionych zagadnień związanych z neuroosteoartropatią należy fakt występowania CN tylko u niektórych chorych z

neuropatią. Ostatnie badania prowadzone w schorzeniach kości przebiegających, podobnie jak neuroosteopropatia, z osteopenią sugerują, że przyczyną jest tutaj udział czynników genetycznych związanych z polimorfizmem genów *OPG* i *RANKL*. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono jedynie dwie prace, w których oceniano związek występowania polimorfizmów genu osteoprotegeryny z neuroosteopropatią Charcota. W obu pracach stwierdzono istnienie związku polimorfizmów genu *OPG* (1181G>C, zlokalizowanego w 1 eksonie i 245T>G w regionie promotora – w przypadku pierwszej z nich oraz 1217C>T i 245T>G w przypadku drugiej z prac) a występowaniem CN. Jednak grupy chorych analizowane w obu pracach były niewielkie. Powyższe obserwacje wskazują na możliwy udział polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* w rozwoju osteopenii w neuroosteopropatii Charcota i stały się podstawą do przeprowadzenia dalszych badań.

Zasadniczym celem niniejszej pracy była próba oceny udziału triady *OPG/RANKL/RANK* oraz polimorfizmu genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* w etiopatogenezie neuroosteopropatii Charcota. Ponadto analizowano również wpływ innych czynników na rozwój tego powikłania.

Do badania włączono 139 osób chorych na cukrzycę, w tym 62 pacjentów z neuroosteopropatią Charcota (CN), 44 chorych z neuropatią bez neuroosteopropatii (N) oraz 33 chorych z cukrzycą bez neuropatii (D). Grupa kontrolna liczyła 94 osoby.

U wszystkich uczestników badania analizowano: częstość występowania poszczególnych **polimorfizmów genów *OPG***: 245T>G (rs3134069) 950T>C (rs2073617), 1181G>C (rs2073618), 1217C>T (rs3102734) 6890A>C (rs7844539), ***RANKL***: 290C>T (rs9525641), 643C>T (rs9533156), 693G>C (rs9533155) i ***RANK***: 421C>T (rs35211496), 575C>T (rs1805034), a w grupie osób chorych (CN, N i D) dodatkowo określano stężenie osteoprotegeryny i *RANKL* w surowicy krwi, stopień wyrównania cukrzycy (HbA1c), poziom CRP, występowanie innych powikłań cukrzycy z grupy mikroangiopatii.

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w średnim wieku badanych chorych i w grupie kontrolnej. Obserwowano znamienne różnice w średnim wieku chorych pomiędzy grupami – chorzy w grupie CN byli młodszy w porównaniu z chorymi w pozostałych dwóch grupach. Średni wskaźnik masy ciała nie różnił się pomiędzy badanymi grupami chorych. Średni poziom HbA1c był najwyższy w grupie CN – był on znamienne wyższy od poziomu HbA1c w grupie D. Średni czas trwania cukrzycy w grupie CN nie różnił się istotnie od

czasu trwania cukrzycy w pozostałych dwóch grupach chorych. Chorzy z CN cechowali się najwyższym, w porównaniu z pozostałymi grupami chorych, średnim stężeniem CRP, stężenie to było jednak tylko nieznacznie wyższe od wartości prawidłowych. U chorych z CN częściej niż w pozostałych grupach pacjentów występowały inne powikłania z grupy mikroangiopatii – retinopatia i nefropatia. Średni poziom osteoprotegeryny oraz stosunek OPG/RANKL był najwyższy w grupie z neuroosteoartropatią (CN) zaś średnie stężenie RANKL było najwyższe w grupie pacjentów z neuropatią (N).

Analiza wpływu czynników genetycznych **dla wariantów genowych genu *OPG*** wykazała istotne różnice w rozkładzie genotypów:

- dla polimorfizmu **245T>G** pomiędzy grupą chorych z neuroosteoartropatią (CN) a grupą chorych z neuropatią (N) oraz pomiędzy grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C),
- dla **polimorfizmu 950 T>C** pomiędzy grupami: z neuroosteoartropatią (CN) i z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C),
- dla polimorfizmu **1181 G>C** pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią (CN) a grupą kontrolną (C),
- dla polimorfizmu **1217C>T** pomiędzy grupą z neuropatią (N) a kontrolną (C),
- dla polimorfizmu **6890A>C** pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią (CN) a grupą chorych bez neuropatii (D) oraz pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C).

W przypadku **wariantów genowych genu *RANKL*** obserwowano istotne różnice w rozkładzie genotypów:

- dla polimorfizmu **643C>T** pomiędzy grupami z neuroosteoartropatią Charcota (CN) i grupą z neuropatią (N) a grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a także pomiędzy grupą chorych na cukrzycę bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C),
- dla polimorfizmu **693G>C** pomiędzy grupą bez neuropatii (D) a grupą kontrolną (C).

Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów polimorfizmu **290C>T** pomiędzy badanymi grupami.

Analizując **warianty genowe genu *RANK*** :

- dla polimorfizmu **421C>T** stwierdzono istotną różnicę rozkładu genotypów pomiędzy grupą z neuroosteoartropatią (CN) a grupą bez neuropatii (D),

- dla polimorfizmu **575C>T** obserwowano różnicę w częstości występowania genotypów pomiędzy grupą z neuropatią (N) a grupą kontrolną (C).

Analiza wariancji w poszczególnych grupach pacjentów wykazała istnienie zależności pomiędzy występowaniem polimorfizmu 245 T>G genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie neuropatii (N), polimorfizmem 950T>C genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie osób z neuroosteartropatią (CN), polimorfizmem 1217C>T genu *OPG* a poziomem osteoprotegeryny w grupie pacjentów z neuropatią (N) oraz polimorfizmem 421 C>T genu *RANKL* a poziomem RANKL również w grupie chorych neuropatią (N).

Analiza regresji logistycznej wykazała statystycznie istotny, niezależny związek wieku chorych, czasu trwania cukrzycy, występowania retinopatii, genotypu TT z rozwojem **neuroosteartropatii Charcota**.

Powyższe wyniki stały się podstawą do sformułowania następujących wniosków:

1. Układ cytokin OPG/RANKL/RANK może odgrywać rolę w etiopatogenezie neuroosteartropatii Charcota. Podwyższony poziom osteoprotegeryny obserwowany w grupie chorych z neuroosteartropatią oraz istotnie wyższy w tej grupie stosunek średniego stężenia OPG/RANKL może odzwierciedlać nieskuteczność mechanizmu kompensacyjnego mającego zahamować proces niszczenia tkanki kostnej.
2. Niewyjaśnione pozostaje zjawisko stwierdzonego wysokiego średniego stężenia RANKL w grupie chorych z neuropatią – było ono znamienne wyższe niż w pozostałych dwóch grupach. Może to wskazywać na zaburzenia współdziałania cytokin szlaku OPG/RANKL/RANK w grupie chorych z neuropatią. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.
3. Wyniki badań wydają się potwierdzać hipotezę odnośnie roli czynników genetycznych w patogenezie neuroosteartropatii Charcota. W szczególności potwierdzono związek występowania wariantu genetycznego 245T>G genu *OPG* z rozwojem neuroosteartropatii i dodatnią korelacją genotypu TT z występowaniem tego powikłania. Polimorfizm 1181G>C genu *OPG* może kandydować do roli potencjalnego markera neuroosteartropatii Charcota charakterystycznego jedynie dla tego powikłania. Warianty genetyczne: 6890A>C genu

OPG oraz 412C>T genu *RANK* mogą być brane pod uwagę jako markery różnicujące osoby z podwyższonym ryzykiem rozwoju neuroosteoartropatii w populacji pacjentów z cukrzycą.

4. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania wariantów genetycznych: genu *OPG*: 245T>G, 950T>C, 1217C>T, genu *RANKL* 643C>T oraz genu *RANK* 575C>T jako markerów neuropatii, a także polimorfizmów: genu *RANKL* 643C>T, 693G>C oraz *OPG* 6890A>C jako markerów cukrzycy.
5. Analiza związku poszczególnych badanych polimorfizmów z poziomami cytokin *OPG* i *RANKL* wykazała, że zależność pomiędzy poziomem białka a genotypem była najlepiej widoczna w grupie chorych z neuropatią.
6. Analiza nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów wykazała istnienie różnic w nierównowadze sprzężeń polimorfizmów genów *OPG* i *RANK* pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną. Wskazuje to, że zmiany na poziomie DNA odgrywają rolę w rozwoju neuroosteoartropatii Charcota.
7. Do czynników mogących mieć potencjalny związek z rozwojem neuroosteoartropatii Charcota należą: wiek chorych, czas trwania cukrzycy oraz występowanie retinopatii.

11. SUMMARY

Neuropathy is one of the most commonly occurring complications of diabetes. Some patients with symmetrical distal neuropathy develop Charcot neuroosteoarthropathy. It is a chronic and progressive condition affecting the skeletal system of the foot, causing complete destruction of bones and disorganization of pedal joints and ligaments.

Gross foot deformity, as a result of neuropathic osteoarthropathy, combined with loss of protective sensation, is the cause of ulcerations, infections, and in many cases requires treatment by amputation of the limb. In its acute phase, Charcot neuroosteoarthropathy manifests itself as a triad of symptoms: unilateral oedema, reddening and local increase in temperature. In some cases, slight pain is present, incommensurate to the extent of the observed changes. Persistent inflammation leads to damage, fractures, subluxation and dislocation of skeletal structures of the foot. Most authors emphasise that in many cases of Charcot neuroosteoarthropathy the diagnosis may be delayed or never made; this is due to the lack of explicit clinical and radiological criteria for diagnosis and because clinical manifestations may mimic other conditions such as bacterial inflammation. Currently, there is no dependable marker test that would allow diagnosis of Charcot neuroosteoarthropathy in its acute phase; furthermore it is not possible to determine which patients affected by neuropathy are at greater risk of developing such complications.

The underlying causes of Charcot neuroosteopathy remain unclear. It is known that an interaction of factors such as presence of diabetes, peripheral neuropathy (both sensory and motor) and metabolic abnormalities affecting bone (osteopenia), is key to the pathogenesis of the disease. At the beginning of the 21st century some reports emerged that gave basis to so called “inflammatory theory”, which stressed the pathogenic importance of locally ongoing inflammation and increased expression of proinflammatory cytokines, including interleukin-1 β , TNF- α and others. Release of proinflammatory cytokines leads to increased activity of the recently discovered metabolic pathway, consisting of OPG (*osteoprotegerin*), RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*) and a ligand to RANK – RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand*). RANKL is involved in most diseases with accompanying osteolysis and disturbance in OPG/RANKL ratio may also be responsible for osteopenia observed in Charcot neuroosteoarthropathy. The same metabolic pathway is also responsible

for vascular calcification observed in patients with Charcot neuroosteoarthropathy.

Results of recent studies in diseases of skeletal system with underlying osteopenia suggest the involvement of genetic factors associated with *OPG* and *RANKL* genes polymorphisms.

So far, only two studies worldwide have evaluated the association between the occurrence of *OPG* gene polymorphism and Charcot neuroosteoarthropathy. Both have ascertained an association between the *OPG* gene polymorphism (1181G>C located in the 1 exon and 245T>G in the promoter region in one of the studies, and 1217C>T and 245G>T in the other) and the occurrence of Charcot neuroosteoarthropathy. However, the populations in both studies were small. These observations suggest possible involvement of the *OPG*, *RANKL* and *RANK* genes polymorphism in the development of osteopenia and vascular calcification in Charcot neuroosteoarthropathy and became the ground for further research.

Determination of dependable, repeatable genetic markers of Charcot neuroosteoarthropathy would help to distinguish patients who are at high risk of developing this condition, right after the diagnosis of diabetes is made. This would allow effective prevention and avoidance of the serious consequences.

The primary intent of this study was to evaluate the role of *OPG*/*RANKL*/*RANK* triad and osteoprotegerin, *RANK* and *RANKL* gene polymorphisms in aetiopathogenesis of Charcot neuroosteoarthropathy. The impact of other factors on the progress of this complication was also analysed.

A total of 139 patients with diabetes including 62 patients with Charcot neuroosteoarthropathy (CN), 44 patients with neuropathy without Charcot neuroosteoarthropathy (N) and 33 patients with diabetes but without neuropathy (D), were included in the study. The control group (C) consisted of 94 healthy individuals.

In all participants, the frequency of specific *OPG* gene polymorphisms: 245T>G (rs3134069) 950T>C (rs2073617), 1181G>C (rs2073618), 1217C>T (rs3102734) 6890A>C (rs7844539) *RANKL* gene polymorphisms: 290C>T (rs9525641), 643C>T (rs9533156), 693G>C (rs9533155) and *RANKL* gene polymorphisms: 421C>T (rs35211496), 575C>T (rs1805034) occurrence was analysed. Concentration levels of osteoprotegerin and *RANKL*, levels of HbA1c (a marker for diabetic control) and CRP as well as occurrence of other

microvascular complications of diabetes were additionally determined in the patient (CN, N, and D) group.

No statistically significant differences in the mean age of subjects were found between the patient group and the control group. Significant statistical difference was found between the patients – those in the CN group were younger than patients in the remaining groups. No significant difference in mean BMI was found. Mean HbA_{1c} was the highest in the CN group, it was significantly higher than in the D group. Average duration of diabetes in the CN group was not significantly different than in the other two groups. Patients with CN presented the highest mean CRP concentration levels of all the patient groups, although only slightly above the normal range. Other microvascular complications, such as retinopathy and nephropathy, occurred more frequently within the CN patient group. The mean osteoprotegerin level and the OPG/RANKL ratio were both highest in the CN group, whereas the highest mean RANKL level was observed in patients with neuropathy (N).

Analysis of the influence of genetic factors for the OPG gene variants showed significant differences in the distribution of genotypes: between the Charcot neuroosteoarthropathy group (CN) and the neuropathy group (N), between the neuropathy group (N) and the control group (C) for 245T>G polymorphism; between the Charcot neuroosteoarthropathy (CN) and neuropathy (N) groups and the control group (C) for 950 T>C polymorphism; between the Charcot neuroosteoarthropathy group (CN) and the control group (C) for 1181 G>C polymorphism; between the neuropathy group (N) and the control group (C) for 1217C>T polymorphism; between the (CN) group and the group without neuropathy (D) as well as between the (D) group and the control group (C) for the 6890A>C polymorphism.

As for the RANKL gene variants, significant differences were observed in the distribution of genotype occurrence: between the Charcot neuroosteoarthropathy (CN) and neuropathy (N) groups and the group without neuropathy (D), also between the (D) group and the control group (C) for 643C>T polymorphism; between the group without neuropathy (D) and the control group (C) for 693G>C polymorphism. No significant differences were found in the genotype distribution between the groups for 290C>T polymorphism.

As a result of the RANK gene variation analysis for 421C>T polymorphism, significant difference in the genotype distribution was found between the Charcot neuroosteoarthropathy group (CN) and the group without neuropathy (D).

Also, a significant difference in genotype occurrence between the neuropathy group (N) and the control group (C) was observed for 575C>T polymorphism.

Analysis of variance performed in the respective patient groups indicated a correlation between the 245 T>G OPG gene polymorphism and osteoprotegerin level in the neuropathy group (N), the 950T>C OPG gene polymorphism and osteoprotegerin level in the Charcot neuroosteoarthropathy group (CN), 1217C>T OPG gene polymorphism and osteoprotegerin level in the neuropathy group (N), and the 421 C>T RANKL gene polymorphism and RANKL level, also in the neuropathy group (N).

Logistic regression analysis showed a statistically significant, independent correlation of age, duration of diabetes, occurrence of retinopathy and TT genotype with the development of Charcot neuroosteoarthropathy.

These results provided the basis for following conclusions:

1. OPG/RANKL/RANK cytokine triad may play a significant role in the etiopathogenesis of Charcot neuroosteoarthropathy. Elevated osteoprotegerin level and a significantly higher mean OPG/RANKL ratio, both observed in the Charcot neuroosteoarthropathy group, may reflect an ineffective compensation mechanism, intended to inhibit the process of bone destruction caused by RANKL activity.
2. High mean RANKL level in the group of patients with neuropathy, remains unexplained. It may reflect a disturbance in the regulatory mechanisms within OPG/RANKL/RANK pathway in this group of patients. This finding requires further study.
3. The study results appear to confirm the hypothesis concerning the role of genetic factors in the pathogenesis of Charcot neuroosteoarthropathy. In particular correlation between 245T>G genetic variant of the OPG gene with Charcot neuroosteoarthropathy development and a positive correlation between the TT genotype and the occurrence of this complication, both observed in earlier studies in Polish population was confirmed. It appears, on basis of the analyses performed, that the 1181G>C polymorphism of the OPG gene that may be a potential marker of Charcot neuroosteoarthropathy, a marker specific to this complication alone. The 6890A>C polymorphism of the OPG gene and the 421C>T genetic variant of the RANK gene may potentially be differentiating mark-

ers for patients with increased risk of Charcot neuroosteoarthropathy within the population of diabetic patients.

4. Results of analyses suggest a possibility of using the 245T>G, 950T>C and 1217C>T genetic variants of the OPG gene, 643C>T polymorphism of the RANKL gene and the 575C>T polymorphism of the RANK gene as markers of neuropathy. 643C>T and 693G>C polymorphism of the RANKL gene and 6890A>C polymorphism of the OPG gene could potentially serve as markers of diabetes.
5. Analysis of the association between each of the tested polymorphisms and OPG and RANKL levels show the most distinctive correlation between the protein level and the genotype occurred in the group of patients with neuropathy.
6. Analysis of linkage disequilibrium of given polymorphisms revealed linkage disequilibrium of OPG and RANK gene polymorphisms between the patients groups and the control group, suggesting a role of changes occurring at DNA level in the development of Charcot neuroosteoarthropathy.
7. Moreover, the analyses showed that patient age, duration of diabetes and the occurrence of retinopathy are associated with the development of Charcot neuroosteoarthropathy.

12. ANEKS

12.1. Warianty polimorficzne genów kodujących triadę OPG/RANKL/RANK

Gen	Według bazy NCBI SNP(rs)	Zmiany w sekwencji wraz z pozycją (wg danych opublikowanych)	Zamiana	Zmiana sensu	Położenie
OPG	3134069	245T>G	T→G	-	Promotor
OPG	2073617	950T>C	T→C	-	Promotor
OPG	2073618	1181G>C	G→C	p.Asn3Lys	Ekson 1
OPG	3102734	1217C>T	C→T	-	Intron 1
OPG	7844539	6890A>C	A→C	-	Intron 4
RANKL	9525641	290C>T	C→T	-	250 par zasad powyżej startu transkrypcji Promotor
RANKL	9533156	643C>T	C→T	-	ok. 1000 par zasad powyżej startu transkrypcji Promotor
RANKL	9533155	693C>G	C→G	-	ok. 1050 par zasad powyżej startu transkrypcji Promotor
RANKL	2277438	-	A→G	-	Intron 2
RANKL	9594759	-	C→T	-	110 par zasad przed genem
RANKL	12585014	-	A→G	-	Promotor
RANKL	7988338	-	A→G	-	Promotor
RANKL	2148073	-	C→G	-	Intron 2
RANKL	12721445	-	C→T	p.Tyr188Ala	Ekson 6
RANK	35211496	421C>T	C→T	p.His141Tyr	Ekson 4
RANK	1805034	575C>T	C→T	p.Ala192Val	Ekson 6
OPG	4355801	-	A→G	-	zlokalizowany na chromosomie 8 powyżej genu osteoprotegeryny
RANKL	346588	-	C→T	-	Intron 5
RANKL	9562414	-	A→G	-	Intron 7
RANKL	633137	-	A→G	-	Intron 7
RANKL	346574	-	C→T	-	Intron 7
RANK	6567276	-	C→T	-	Intron 9
RANK	17665435	-	A→T	-	Zlokalizowany poniżej genu RANK
RANK	12956925	-	A→G	-	Intron 1
RANK	8083511	-	A→C	-	Intron 6
RANK	9962159	-	A→G	-	Intron 1
RANK	12458117	+34863G>A	A→G	-	Intron 6

Gen	Według bazy NCBI SNP(rs)	Zmiany w sekwencji wraz z pozycją (wg danych opublikowanych)	Zamiana	Zmiana sensu	Położenie
RANK	-	+35928insdelC (opisany w ten sposób w literaturze po raz pierwszy, brak innych danych)	-	-	Intron 6
RANK	3018362	-	A → G	-	Zlokalizowany poniżej genu RANK

12.2. Występowanie poszczególnych polimorfizmów genów *OPG*, *RANKL* i *RANK* a stężenie *OPG* w osoczu w badanych grupach chorych (łącznie)

Poziom *OPG* dla różnych polimorfizmów

245T>G	T/T	T/G	G/G	Analizy statystyczne ($\alpha=0,05$)
OPG	średnia=5,8(\pm 2,6)	średnia=7,5(\pm 2,1)	- (pojedynczy pomiar)	ANOVA F=8,0 p=0,005 istotne różnice pomiędzy w poziomie <i>OPG</i> dla polimorfizmów (p=0,03, test Tukeya)
950T>C	T/T	T/C	C/C	
OPG	średnia=5,1(\pm 2,2)	średnia=6,2(\pm 2,7)	średnia=6,4(\pm 2,6)	ANOVA F=2,5 p=0,09
1181G>C	G/G	G/C	C/C	
OPG	średnia=5,2(\pm 2,0)	średnia=6,2(\pm 2,7)	średnia=6,1(\pm 2,6)	ANOVA F=1,3 p=0,27
1217C>T	C/C	C/T	T/T	
OPG	- (pojedynczy wynik)	średnia=7,4(\pm 2,3)	średnia=5,8(\pm 2,5)	ANOVA F=6,8 p=0,01 istotne różnice pomiędzy w poziomie <i>OPG</i> dla polimorfizmów (p=0,045, test Tukeya)
6890A>C	A/A	A/C	C/C	
OPG	średnia=6,1(\pm 2,7)	średnia=5,8(\pm 2,3)	średnia=6,1(\pm 2,4)	ANOVA F=0,1 p=0,9
290C>T	C/C	C/T	T/T	
OPG	średnia=6,3(\pm 2,6)	średnia=6,8(\pm 2,4)	średnia=6,1(\pm 2,9)	ANOVA F=0,4 p=0,7
643C>T	C/C	C/T	T/T	
OPG	średnia=6,1(\pm 2,7)	średnia=6,0(\pm 2,5)	-	ANOVA F=0,09 p=0,76
693G>C	G/G	G/C	C/C	
OPG	średnia=6,2(\pm 2,7)	średnia=5,8(\pm 2,4)	średnia=6,2(\pm 2,8)	ANOVA F=0,3 p=0,7
421C>T	C/C	C/T	T/T	
OPG	średnia=5,9(\pm 2,5)	średnia=7,1(\pm 2,7)	średnia=4,3(\pm 2,2)	ANOVA F=3,5 p=0,03 istotne różnice pomiędzy w poziomie <i>OPG</i> dla polimorfizmów C/T-T/T (p=0,047, test Tukeya)

575C>T	C/C	C/T	T/T	
OPG	średnia=5,9(±2,6)	średnia=6,3(±2,6)	średnia=5,7(±2,6)	ANOVA F=0,6 p=0,6

Poziom RANKL dla różnych polimorfizmów

245T>G	T/T	T/G	G/G	Analizy statystyczne ($\alpha=0,05$)
RANKL	średnia=1,1(±1,5) mediana=0,4(0-5,3)	średnia=2,2(±2,1) mediana=1,7(0,07-6,5)	- (pojedynczy pomiar)	Test Kruskala-Wallisa: H=6,250109 p =,012
950T>C	T/T	T/C	C/C	
RANKL	średnia=1,1(±1,4) mediana=0,5(0-4,7)	średnia=1,3(±1,6) mediana=0,5(0-5,3)	średnia=1,4(±1,9) mediana=0,3(0-6,5)	Test Kruskala-Wallisa: H=0,019 p =0,9
1181G>C	G/G	G/C	C/C	
RANKL	średnia=3,9(±2,1) mediana=0,07(0-2,5)	średnia=3,8(±2,2) mediana=0,6(0-6,5)	średnia=3,6(±1,9) mediana=0,5(0-5,3)	Test Kruskala-Wallisa: H=4,8 p =0,09
1217C>T	C/C	C/T	T/T	
RANKL	- (pojedynczy pomiar)	średnia=4,6(±2,5) mediana=1,2(0,05-6,5)	średnia=3,6(±2,0) mediana=0,4(0-5,3)	Test Kruskala-Wallisa: H=3,8 p =0,05
6890A>C	A/A	A/C	C/C	
RANKL	średnia=3,9(±2,1) mediana=0,2(0-6,5)	średnia=3,3(±1,8) mediana=1,4(0-5,3)	średnia=2,6(±1,9) mediana=1,1(0,6-1,8)	Test Kruskala-Wallisa: H=3,6 p =0,2
290C>T	C/C	C/T	T/T	
RANKL	średnia=3,9(±2,4) mediana=0,5(0-4,9)	średnia=3,6(±1,9) mediana=0,3(0-6,5)	średnia=3,9(±2,1) mediana=0,6(0-5,3)	Test Kruskala-Wallisa: H=0,3 p =0,9
643C>T	C/C	C/T	T/T	
RANKL	średnia=3,9(±2,4) mediana=0,5(0-6,5)	średnia=3,7(±1,9) mediana=0,4(0-4,9)	- (pojedynczy wynik)	Test Kruskala-Wallisa: H=0,2 p =0,9
693G>C	G/G	G/C	C/C	
RANKL	średnia=4,1(±2,4) mediana=0,4(0-4,9)	średnia=3,5(±1,9) mediana=0,3(0-6,5)	średnia=3,8(±1,9) mediana=0,6(0-5,3)	Test Kruskala-Wallisa: H=0,2 p =0,9
421C>T	C/C	C/T	T/T	
RANKL	średnia=3,8(±2,0) mediana=0,6(0-6,5)	średnia=3,5(±2,1) mediana=0,2 (0-3,7)	średnia=3,9(±2,7) mediana=0,01(0-3,8)	Test Kruskala-Wallisa: H=3,0 p=0,2
575C>T	C/C	C/T	T/T	
RANKL	średnia=3,8(±2,2) mediana=0,2(0-6,5)	średnia=4,1(±1,9) mediana=0,4(0-5,3)	średnia=3,2(±2,1) mediana=0,8(0-5,3)	Test Kruskala-Wallisa: H=0,3 p =0,9

A6890C D	0,0080917	-0,0306349	0,0199185	-0,0061719	-0,0129265
A6890C D'	0,1236306	0,6340593	0,2979353	0,3923486	0,2045216
A6890C Corr,	0,0479803	-0,1882166	0,1181355	-0,0562745	-0,0766936
A6890C X^2	1,0727846	16,5082728	6,5034948	1,4757378	2,7409710
A6890C P	0,3003173	4,843827e-05	0,01076627	0,2244426	0,09780532
A6890C n	233	233	233	233	233
C290T D	-0,1419343	-0,1419343	0,1868984	0,0055948	-0,0179414
C290T D'	0,7690861	0,7690861	0,7639884	0,0931128	0,0743174
C290T Corr,	-0,5882548	-0,5882548	0,7477659	0,0344121	-0,0718080
C290T X^2	161,2563841	161,2563841	260,5657203	0,5518340	2,4028796
C290T P	< 2,2204e-16	< 2,2204e-16	< 2,2204e-16	0,4575693	0,1211121
C290T n	233	233	233	233	233
C643T D	-0,1752945	-0,1752945	-0,1752945	-0,0037738	0,0366926
C643T D'	0,9706817	0,9706817	0,9706817	0,0850824	0,1922228
C643T Corr,	-0,7266853	-0,7266853	-0,7266853	0,1521643	0,1521643
C643T X^2	246,0812991	246,0812991	0,2695572	10,7897517	10,7897517
C643T P	< 2,2204e-16	< 2,2204e-16	0,603629	0,001020636	0,001020636
C643T n	233	233	233	233	233
G693C D	0,0084061	0,0084061	0,0084061	-0,0390997	-0,0390997
G693C D'	0,1369622	0,1369622	0,1369622	0,1655116	0,1655116
G693C Corr,	0,0517159	0,0517159	0,0517159	-0,1565273	-0,1565273
G693C X^2	1,2463313	1,2463313	1,2463313	11,4173715	11,4173715
G693C P	0,2642543	0,2642543	0,0007276056	0,0007276056	0,0007276056
G693C n	233	233	233	233	233
C421T D	-0,0361186	-0,0361186	-0,0361186	-0,0361186	-0,0361186
C421T D'	0,6224898	0,6224898	0,6224898	0,6224898	0,6224898
C421T Corr,	-0,2222885	-0,2222885	-0,2222885	-0,2222885	-0,2222885
C421T X^2	23,0260796	23,0260796	23,0260796	23,0260796	23,0260796
C421T P	1,598186e-06	1,598186e-06	1,598186e-06	1,598186e-06	1,598186e-06
C421T n	233	233	233	233	233

Sprzeżenie alleli (niezrównoważenie sprzeżeń) dla poszczególnych grup CN (neuroosteopatia Charcota), N (neuropatia), D (cu-krzyca bez neuropatii) i C (grupa kontrolna)

CN	T950C	G1181C	C12117T	A6890C	C290T	C643T	G693C	C421T	C575T
T245G D	-0,0194588	0,0292142	0,0459936	0,0003124	0,0011881	-0,0087548	0,0011881	0,0006870	-0,0237512
T245G D'	0,9973259	0,9982173	0,9988670	0,0070236	0,0475741	0,4985703	0,0475741	0,0169276	0,9978080
T245G Corr,	-0,1848591	0,2784789	0,9988670	0,0053474	0,0110795	-0,0848504	0,0110795	0,0087042	-0,2213993

T245G X ²	4,2374382	9,6162616	123,7191805	0,0035458	0,0152316	0,8927487	0,0152316	0,0093947	6,0781890
T245G P	0,03954179	0,001928619	< 2,2204e-16	0,9525169	0,9018094	0,3447335	0,9018094	0,922785	0,0136861
T245G n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
T950C D	0,2021909	0,2021909	-0,0194588	0,0480720	0,0415306	-0,0481017	-0,0341021	0,0287738	0,0241250
T950C D'	0,8573873	0,8573873	0,9973259	0,9988579	0,1995545	0,3287165	0,1747846	0,2989370	0,1177605
T950C Corr,	0,8430927	0,8430927	-0,1848591	0,3599002	0,1694123	-0,2039311	-0,1391099	0,1594809	0,0983726
T950C X ²	88,1398604	88,1398604	4,2374382	16,0614951	3,5588652	5,1568978	2,3995927	3,1538374	1,1999687
T950C P	< 2,2204e-16	0,03954179	6,131825e-05	0,05922822	0,05922822	0,02315422	0,1213668	0,07574863	0,2733279
T950C n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
G1181C D	0,0292142	0,0292142	0,0145560	0,0113392	0,0113392	-0,0098427	-0,0029985	0,0169147	-0,0026122
G1181C D'	0,9982173	0,9982173	0,2984175	0,0555969	0,0555969	0,0686353	0,0156819	0,1733874	0,0134377
G1181C Corr,	0,2784789	0,2784789	0,1093464	0,0464122	0,0464122	-0,0418704	-0,0122731	0,0940694	-0,0106878
G1181C X ²	9,6162616	9,6162616	1,4826224	0,2671080	0,2671080	0,2173887	0,0186779	1,0972823	0,0141643
G1181C P	0,001928619	0,001928619	0,2233647	0,6052784	0,6052784	0,6410369	0,891294	0,2948633	0,9052643
G1181C n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
C1217T D	0,0003124	0,0003124	0,0011881	0,0011881	0,0011881	-0,0087548	0,0011881	0,0006870	-0,0237512
C1217T D'	0,0070236	0,0070236	0,0475741	0,0475741	0,0475741	0,4985703	0,0475741	0,0169276	0,9978080
C1217T Corr,	0,0053474	0,0053474	0,0110795	0,0110795	0,0110795	-0,0848504	0,0110795	0,0087042	-0,2213993
C1217T X ²	0,0035458	0,0035458	0,0152316	0,0152316	0,0152316	0,8927487	0,0152316	0,0093947	6,0781890
C1217T P	0,9525169	0,9525169	0,9018094	0,9018094	0,9018094	0,3447335	0,9018094	0,922785	0,0136861
C1217T n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
A6890C D	0,0294367	0,0294367	0,0294367	0,0294367	0,0294367	-0,0292114	-0,0259017	0,0086872	0,0265276
A6890C D'	0,7072160	0,7072160	0,7072160	0,7072160	0,7072160	0,9981219	0,6637752	0,1284373	0,6474416
A6890C Corr,	0,2163286	0,2163286	0,2163286	0,2163286	0,2163286	-0,2231125	-0,1903506	0,0867442	0,1948738
A6890C X ²	5,8029620	5,8029620	6,1726179	5,8029620	5,8029620	6,1726179	4,4929347	0,9330446	4,7090005
A6890C P	0,0159992	0,0159992	0,01297425	0,01297425	0,01297425	0,01297425	0,0340352	0,334073	0,03000509
A6890C n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
C290T D	0,1651702	0,1651702	-0,2340881	0,0200586	0,0200586	-0,1651702	-0,2340881	0,0200586	0,0457856
C290T D'	0,9406134	0,9406134	0,9998161	0,2409534	0,2409534	0,9406134	0,9998161	0,2409534	0,1862432
C290T Corr,	0,6873683	0,6873683	-0,9373276	0,1091304	0,1091304	-0,6873683	-0,9373276	0,1091304	0,1832615
C290T X ²	58,5869305	58,5869305	108,9442976	1,4767714	1,4767714	58,5869305	108,9442976	1,4767714	4,1645144
C290T P	1,942890e-14	1,942890e-14	< 2,2204e-16	0,2242803	0,2242803	< 2,2204e-16	< 2,2204e-16	0,2242803	0,04127924
C290T n	62	62	62	62	62	62	62	62	62
C643T D	0,1775928	0,1775928	-0,0221968	0,0221968	0,0221968	-0,1775928	-0,0221968	0,0221968	-0,0557212
C643T D'	0,9481483	0,9481483	0,3792193	0,3792193	0,3792193	0,9481483	0,3792193	0,3792193	0,3121201
C643T Corr,	0,7390662	0,7390662	-0,1255109	-0,1255109	-0,1255109	0,7390662	-0,1255109	-0,1255109	-0,2317977

C1217T	X ²	1,7715933	0,5389245	7,0897313	2,5036325	1,7715933	0,8104131			
C1217T	P	0,1831850	0,4628788	0,007752687	0,1135840	0,1831850	0,3679981			
C1217T	n	44	44	44	44	44	44			
A6890C	D	0,0073023	0,0526209	-0,0526209	0,0109259	-0,0072591	-0,0411795			
A6890C	D'	0,1024432	0,9987657	0,9987657	0,1500176	0,3903798	0,6993286			
A6890C	Corr,	0,0426011	-0,3149126	-0,3149126	0,0638238	-0,0616389	-0,2422545			
A6890C	X ²	0,1597073	8,7269551	8,7269551	0,3584665	0,3343432	5,1644794			
A6890C	P	0,6894261	0,003135397	0,003135397	0,5493592	0,5631127	0,02305337			
A6890C	n	44	44	44	44	44	44			
C290T	D	-0,1544565	0,8376126	0,8376126	0,1951258	-0,0267577	-0,0316158			
C290T	D'	0,8376126	0,6350845	0,6350845	0,8011954	0,4111343	0,1534038			
C290T	Corr,	-0,6350845	35,4932448	35,4932448	0,7831333	-0,1561037	-0,1277876			
C290T	X ²	2,559366e-09	2,559366e-09	2,559366e-09	53,9702066	2,1444169	1,4370115			
C290T	P	44	44	44	2,035039e-13	0,1430894	0,2306236			
C290T	n	44	44	44	44	44	44			
C643T	D	-0,1799435	0,9996285	0,9996285	-0,1799435	0,0100992	0,0070475			
C643T	D'	0,9996285	0,1206916	0,1206916	0,9996285	0,0321036	0,0321036			
C643T	Corr,	-0,1206916	0,0604391	0,0604391	-0,7408397	0,0604391	0,0292206			
C643T	X ²	48,2982189	0,3214541	0,3214541	48,2982189	0,3214541	0,0751384			
C643T	P	3,660849e-12	0,5707351	0,5707351	3,660849e-12	0,5707351	0,7833971			
C643T	n	44	44	44	44	44	44			
G693C	D	-0,0240914	0,3791955	0,3791955	-0,0240914	-0,0306087	0,0306087			
G693C	D'	0,3791955	0,1521400	0,1521400	0,3791955	0,1521400	0,1521400			
G693C	Corr,	-0,1521400	0,1407311	0,1407311	-0,1407311	-0,1238777	0,1238777			
G693C	X ²	1,7428606	1,3504205	1,3504205	1,7428606	1,3504205	1,3504205			
G693C	P	0,1867768	0,2452046	0,2452046	0,1867768	0,2452046	0,2452046			
G693C	n	44	44	44	44	44	44			
C421T	D	-0,0450943	0,7658112	0,7658112	-0,0450943	0,0450943	0,0450943			
C421T	D'	0,7658112	0,2652848	0,2652848	0,7658112	0,2652848	0,2652848			
C421T	Corr,	-0,2652848	6,1930894	6,1930894	-0,2652848	6,1930894	6,1930894			
C421T	X ²	0,01282501	0,01282501	0,01282501	0,01282501	0,01282501	0,01282501			
C421T	P	44	44	44	44	44	44			
C421T	n	44	44	44	44	44	44			
T245G	D	T950C	G1181C	C1217T	A6890C	C290T	C643T	G693C	C421T	C575T
T245G	D'	0,0291430	0,0309172	0,0518079	0,0024831	-0,0091435	0,0117443	0,0190693	-0,0054377	0,0265890
T245G	Corr,	0,5877179	0,6066458	0,6268754	0,0360542	0,2553133	0,1740074	0,3296266	0,9869513	0,5217202
T245G		0,2035914	0,2166891	0,6268754	0,0201549	-0,0650924	0,0934203	0,1378927	-0,0792738	0,1863543

T245G	X ²	2,7356655	3,0989749	25,9362047	0,0268105	0,2796432	0,5760055	1,2549498	0,4147666	2,2920443
T245G	P	0,09813062	0,07834161	3,528882e-07	0,8699364	0,5969352	0,4478823	0,2626092	0,5195601	0,1300385
T245G	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
T950C	D	-0,0232025	0,0291430	0,0291430	-0,1101250	-0,0432173	-0,0162054	-0,0265806	-0,0066355	-0,0072647
T950C	D'	0,1161723	0,5877179	0,5877179	0,9993839	0,2413520	0,1384135	0,1608127	0,2408697	0,0363734
T950C	Corr,	-0,0938880	0,2035914	0,2035914	-0,5160796	-0,1776302	-0,0744242	-0,1109713	-0,0558503	-0,0293962
T950C	X ²	0,5817873	2,7356655	2,7356655	17,5783209	2,0824652	0,3655715	0,8127652	0,2058710	0,0570330
T950C	P	0,4456126	0,09813062	2,757137e-05	0,1489994	0,1489994	0,5454281	0,367304	0,6500231	0,8112483
T950C	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
G1181C	D	0,0508975	0,0235054	-0,0434973	-0,0235054	-0,0434973	0,0039006	0,0145749	-0,0265580	-0,0083762
G1181C	D'	0,9986922	0,9986922	0,2512918	0,2206669	0,2512918	0,0270125	0,0714959	0,9973003	0,0433850
G1181C	Corr,	0,3567250	-0,1105122	-0,1793631	-0,1105122	-0,1793631	0,0179719	0,0610470	-0,2242633	-0,0340045
G1181C	X ²	8,3986796	0,8060545	2,1232951	0,8060545	2,1232951	0,0213172	0,2459645	3,3194061	0,0763162
G1181C	P	0,003754937	0,3692893	0,1450741	0,3692893	0,1450741	0,883918	0,619931	0,06846656	0,7823531
G1181C	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
C1217T	D	-0,0219661	-0,0164468	-0,0164468	-0,0219661	-0,0164468	-0,0009102	0,0059560	-0,0054377	0,0086400
C1217T	D'	0,9967116	0,4592466	0,4592466	0,9967116	0,4592466	0,0388713	0,1029529	0,9869513	0,1695311
C1217T	Corr,	-0,1782972	-0,1170854	-0,1170854	-0,1782972	-0,1170854	-0,0072403	0,0430683	-0,0792738	0,0605552
C1217T	X ²	2,0981327	0,9047927	0,9047927	2,0981327	0,9047927	0,0034598	0,1224320	0,4147666	0,2420172
C1217T	P	0,1474791	0,3414998	0,3414998	0,1474791	0,3414998	0,9530952	0,7264224	0,5195601	0,622753
C1217T	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
A6890C	D	0,0159255	0,0159255	0,0159255	-0,0222400	-0,0222400	-0,0042569	0,0042569	0,0112958	-0,0195702
A6890C	D'	0,1083932	0,1083932	0,3561663	0,1083932	0,3561663	0,3561663	0,0275939	0,2460215	0,1837234
A6890C	Corr,	0,0760537	0,0760537	-0,1186736	-0,0760537	-0,1186736	-0,1186736	0,0206494	0,1104669	-0,0920105
A6890C	X ²	0,3817551	0,9295066	0,3817551	0,9295066	0,3817551	0,9295066	0,0281422	0,8053939	0,5587518
A6890C	P	0,5366654	0,5366654	0,5366654	0,3349912	0,3349912	0,3349912	0,8667748	0,3694856	0,4547636
A6890C	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
C290T	D	0,1881860	-0,0016000	-0,0016000	0,1881860	-0,0016000	0,1881860	0,1881860	-0,0016000	0,0238799
C290T	D'	0,8538937	0,0670147	0,0670147	0,8538937	0,0670147	0,8538937	0,8538937	0,0670147	0,1081296
C290T	Corr,	0,8006231	-0,0137234	-0,0137234	0,8006231	-0,0137234	0,8006231	0,8006231	-0,0137234	0,0984698
C290T	X ²	42,3058280	0,0124299	0,0124299	42,3058280	0,0124299	42,3058280	42,3058280	0,0124299	0,6399561
C290T	P	7,805956e-11	0,9112284	0,9112284	7,805956e-11	0,9112284	7,805956e-11	7,805956e-11	0,9112284	0,4237267
C290T	n	33	33	33	33	33	33	33	33	33
C643T	D	0,1638397	-0,0016301	-0,0016301	0,1638397	-0,0016301	0,1638397	0,1638397	-0,0016301	0,0792743
C643T	D'	0,9995599	0,1044244	0,1044244	0,9995599	0,1044244	0,9995599	0,9995599	0,1044244	0,5489967
C643T	Corr,	0,7788508	-0,0156229	-0,0156229	0,7788508	-0,0156229	0,7788508	0,7788508	-0,0156229	0,3652565

C643T	X^2	40,0361692	0,0161090	8,8052140					
C643T	P	2,493037e-10	0,8990027	0,003003709					
C643T	n		33	33					
G693C	D	0,0009515	0,0434099						
G693C	D'	0,0246709	0,2129433						
G693C	Corr,	0,0082897	0,1818222						
G693C	X^2	0,0045355	2,1819136						
G693C	P	0,9463064	0,1396407						
G693C	n		33	33					
C421T	D	0,0076841							
C421T	D'	0,2261606							
C421T	Corr,	0,0648863							
C421T	X^2	0,2778753							
C421T	P	0,5980972							
C421T	n		33	33					
T245G	D	0,0065641	C643T	0,0065641	G693C	C421T	C575T		
T245G	D'	0,2959183	-0,0159709	-0,0038896	-0,0159709	-0,0038896	-0,0183475		
T245G	Corr,	0,0706454	0,9955451	0,9819578	0,9955451	0,9819578	0,9961200		
T245G	X^2	0,9382644	-0,1703418	-0,0666289	-0,1703418	-0,0666289	-0,1938211		
T245G	P	0,3327246	0,0195116	0,8346102	0,0195116	0,8346102	0,007871302		
T245G	n	94	94	94	94	94	94		
T950C	D	0,0318945	-0,0080626	-0,0102253	-0,0080626	-0,0102253	0,0475362		
T950C	D'	0,1360791	0,0445324	0,2287353	0,0445324	0,2287353	0,2238669		
T950C	Corr,	0,1316707	-0,0329858	-0,0671883	-0,0329858	-0,0671883	0,1926240		
T950C	X^2	3,2593870	0,2045559	0,8486828	0,2045559	0,8486828	6,9755558		
T950C	P	0,07101567	0,6510683	0,3569252	0,6510683	0,3569252	0,008263056		
T950C	n	94	94	94	94	94	94		
G1181C	D	0,0065641	-0,0159709	-0,0038896	-0,0159709	-0,0038896	-0,0183475		
G1181C	D'	0,2959183	0,9955451	0,9819578	0,9955451	0,9819578	0,9961200		
G1181C	Corr,	0,0706454	-0,1703418	-0,0666289	-0,1703418	-0,0666289	-0,1938211		
G1181C	X^2	0,9382644	0,8346102	0,8346102	0,8346102	0,8346102	7,0625242		
G1181C	P	0,3327246	0,0195116	0,3609428	0,0195116	0,3609428	0,007871302		
G1181C	n	94	94	94	94	94	94		
C1217T	D	-0,0359776	0,0075318	0,0014866	0,0075318	0,0014866	0,0441249		
C1217T	D'	0,1901307	0,0328645	0,0262715	0,0328645	0,0262715	0,1865491		
C1217T	Corr,	-0,1469235	0,0304815	0,0096628	0,0304815	0,0096628	0,1768702		

C1217T	X ²	0, 1134319	3, 8254740	4, 0582649	0, 1746751	0, 0175536	5, 8812194
C1217T	P	0, 7362703	0, 05047907	0, 04395564	0, 6759898	0, 8945968	0, 01530322
C1217T	n	94	94	94	94	94	94
A6890C	D	-0, 0074262	-0, 0234140	-0, 0212495	0, 0212495	-0, 0129369	-0, 0215859
A6890C	D'	0, 1254037	0, 4734238	0, 4734238	0, 3051778	0, 9940074	0, 3566766
A6890C	Corr,	-0, 0453490	-0, 1456028	-0, 1309556	0, 1309556	-0, 1280477	-0, 1317578
A6890C	X ²	0, 3866272	3, 9856341	3, 2240835	3, 2240835	3, 0824901	3, 2637004
A6890C	P	0, 5340777	0, 04588982	0, 0725624	0, 0725624	0, 07913928	0, 07082912
A6890C	n	94	94	94	94	94	94
C290T	D	-0, 1019713	-0, 1019713	0, 1410165	0, 1410165	0, 0157366	-0, 0208654
C290T	D'	0, 5211210	0, 5211210	0, 6343499	0, 6343499	0, 2866988	0, 0871402
C290T	Corr,	-0, 4157873	-0, 4157873	0, 5698292	0, 5698292	0, 1021296	-0, 0835090
C290T	X ²	32, 5012671	61, 0445924	61, 0445924	61, 0445924	1, 9609239	1, 3110652
C290T	P	1, 191148e-08	5, 551115e-15	5, 551115e-15	0, 1614145	0, 1614145	0, 2522019
C290T	n	94	94	94	94	94	94
C643T	D	-0, 1671854	-0, 0015080	-0, 1671854	-0, 1671854	-0, 0015080	0, 1059312
C643T	D'	0, 9598764	0, 0350657	0, 9598764	0, 9598764	0, 0350657	0, 5185639
C643T	Corr,	-0, 6879609	-0, 0099665	-0, 6879609	-0, 6879609	-0, 0099665	0, 4317381
C643T	X ²	88, 9785452	0, 0186741	88, 9785452	0, 0186741	35, 0427913	35, 0427913
C643T	P	< 2, 2204e-16	0, 8913049	0, 8913049	3, 225388e-09	3, 225388e-09	3, 225388e-09
C643T	n	94	94	94	94	94	94
G693C	D	0, 0093856	0, 0093856	0, 0093856	0, 0093856	0, 0160362	0, 0160362
G693C	D'	0, 1550114	0, 0736559	0, 1550114	0, 1550114	0, 0736559	0, 0736559
G693C	Corr,	0, 0614714	0, 0647707	0, 0614714	0, 0614714	0, 0647707	0, 0647707
G693C	X ²	0, 7104023	0, 7104023	0, 7104023	0, 7104023	0, 7887061	0, 7887061
G693C	P	0, 3993103	0, 3993103	0, 3993103	0, 3993103	0, 3744917	0, 3744917
G693C	n	94	94	94	94	94	94
C421T	D	0, 0536794	0, 0536794	0, 0536794	0, 0536794	0, 0536794	0, 0536794
C421T	D'	0, 9985492	0, 9985492	0, 9985492	0, 9985492	0, 9985492	0, 9985492
C421T	Corr,	0, 3482171	0, 3482171	0, 3482171	0, 3482171	0, 3482171	0, 3482171
C421T	X ²	22, 7959723	22, 7959723	22, 7959723	22, 7959723	22, 7959723	22, 7959723
C421T	P	1, 801428e-06	1, 801428e-06	1, 801428e-06	1, 801428e-06	1, 801428e-06	1, 801428e-06
C421T	n	94	94	94	94	94	94