

Agnieszka Jankowska

**STĘŻENIE OSTEOPROTEGERYNY I LIGANDA RECEPTORA
AKTYWUJĄCEGO CZYNNIK JĄDROWY KAPPA B W PRZEBIEGU
NIESWOISTYCH ZAPALEŃ JELIT U DZIECI.**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Barbara Kamińska

Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2009

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|---------|--|
| BMC | zawartość mineralna kości (<i>bone mineral content</i>) |
| BMD | gęstość mineralna kości (<i>bone mineral density</i>) |
| BMI | współczynnik masy ciała (<i>body mas index</i>) |
| Ch. L-C | choroba Leśniowskiego - Crohna |
| CI | współczynnik Cole'a (<i>Cole index</i>) |
| CRP | Białko reaktywne –C (<i>C-reactive protein</i>) |
| DC | komórki dendrytyczne (<i>dendritic cells</i>) |
| DXA | absorpcjometria promieniowania rentgenowskiego o dwóch energiach (<i>Dual X- ray absorptometry</i>) |
| ELISA | test immunoenzymatyczny (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| GKS | glikokortykosterydy (<i>glukocorticosteroids</i>) |
| hFOB | komórki ludzkich fibroblastów (<i>human fetal osteoblastic cell line</i>) |
| hMS | komórki macierzyste szpiku kostnego (<i>human marrow stromal cell line</i>) |
| IFN | interferon (<i>interferon</i>) |
| IL | interleukina (<i>interleukin</i>) |
| ISCD | Międzynarodowe Towarzystwo Densytometrii Klinicznej (<i>The Internatinal Society for Clinical Densitometry</i>) |
| MAX | wartość maksymalna |
| M-CSF | czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (<i>Macrophage colony stimulating factor</i>) |
| MG-63 | komórki mięsaka kostnego |
| MIN | wartość minimalna |
| N | liczebność, liczba |
| NGT | żywienie dojelitowe przez zgłębnik dożołądkowy. (<i>naso gastral tube</i>) |
| NZJ | nieswoiste zapalenie jelit |
| OB. | szybkość opadania krwinek czerwonych |
| ODF | czynnik różnicowania osteoklastów (<i>osteoclast differentiation factor</i>) |
| OPG | osteoprotegeryna (<i>osteoprotegerin</i>) |
| PCDAI | współczynnik aktywności choroby Lesniowskieg – Crohna (<i>Pediatric Crohn's Disease Activity Index</i>) |
| PLT | liczba płytek krwi (<i>platelet cells</i>) |
| RANK | receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B |

(receptor activator of NF- kappaB)

| | |
|---------|---|
| RANKL | ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B <i>(receptor activator of NF-kappaB ligand)</i> |
| sRANKL | rozpuszczalna postać ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy <i>(soluble receptor activator of NF-kappaB ligand)</i> |
| SD | odchylenie standardowe <i>(standard deviation)</i> |
| TNF | czynnik martwicy guzów <i>(tumor necrosis factor)</i> |
| TNFR | receptor dla czynnika martwicy guzów <i>(tumor necrosis factor receptor)</i> |
| TRAIL | czynnik inicjujący apoptozę <i>(TNF-related apoptosis-induced ligand)</i> |
| WBC | liczba krwinek białych <i>(white blood cells)</i> |
| WHO | światowa organizacja zdrowia <i>(World Health Organization)</i> |
| wzjg | wrzodziejące zapalenie jelita grubego |
| Z-score | liczba odchyleń standardowych od średniej dla danego wieku i płci badanej populacji. |

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| 1. WSTĘP | 5 |
| 1.1. Wprowadzenie | |
| 1.2. Tkanka kostna i zaburzenia jej metabolizmu/mineralizacji | |
| 1.3. Charakterystyka układu: Osteoprotegeryna- Ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy- receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B (OPG-RANKL-RANK) | |
| 1.4. Nieswoiste zapalenia jelit – epidemiologia, etiologia, obraz kliniczny, diagnostyka i leczenie | |
| 1.5. Zaburzenia mineralizacji kości – ocena gęstości mineralnej kości i leczenie jej zaburzeń | |
| 2. CELE PRACY | 20 |
| 3. PACJENCI I METODY | 21 |
| 3.1. Charakterystyka badanej populacji | 21 |
| 3.2. Oznaczanie stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi | 27 |
| 3.3. Oznaczanie stężenia liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy krwi | 28 |
| 3.4. Badanie gęstości mineralnej kości | 28 |
| 3.5. Metody statystyczne | 29 |
| 4. WYNIKI | 32 |
| 4.1. Charakterystyka badanej populacji | 32 |
| 4.2. Dane o grupie dzieci chorych | 35 |
| 4.3. Ocena gęstości mineralnej kości | 40 |
| 4.4. Stężenie osteoprotegeryny (OPG) w relacji z wybranymi parametrami klinicznymi | 42 |
| 4.5. Stężenie rozpuszczalnej formy liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (sRANKL) w relacji z wybranymi parametrami klinicznymi | 52 |
| 4.6. Podsumowanie wyników | 67 |
| 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja | 69 |
| 6. WNIOSKI | 95 |
| 7. ANEKS | 96 |
| 8. STRESZCZENIE | 101 |
| 9. PIŚMIENNICTWO | 103 |

WSTĘP

Ogromny postęp, jaki dokonuje się w dziedzinie nauk medycznych owocuje nowymi, coraz doskonalszymi metodami badawczymi. Umożliwiają one rozpoznawanie i bardziej efektywne leczenie licznych jednostek i zespołów chorobowych. Niemniej jednak, nadal wiele pytań dotyczących etiologii, patogenezы oraz terapii niektórych schorzeń pozostaje bez odpowiedzi.

Współwystępowanie u ludzi różnych chorób, wymagających szerokiej diagnostyki, doprowadziło do rozwoju nowych gałęzi nauk medycznych.

Przyspieszone niszczenie tkanki kostnej, towarzyszące chorobom zapalnym, schorzeniom o podłożu autoimmunologicznym, chorobom nowotworowym i wielu innym patologiom, przyczyniło się do narodzin bardzo ważnej gałęzi medycyny, jaką jest osteoimmunologia.

Po raz pierwszy termin ten został użyty w 2000 roku, przez *Arron i wsp.*, którzy podkreślili istnienie związku między układem odpornościowym i kostnym [1]. Od tego czasu obserwujemy bardzo dynamiczny rozwój tej dziedziny nauki. Coraz więcej jest wiadomo o procesach zachodzących w obrębie tkanki kostnej w zdrowiu i w chorobie.

Zaburzenia mineralizacji kości są coraz częściej obserwowanym zjawiskiem zarówno wśród dorosłych jak i dzieci. Mogą one wynikać bezpośrednio z patologii tkanki kostnej (pierwotne zaburzenia mineralizacji), bądź stanowić powikłanie innych chorób lub stosowanego leczenia (wtórne zaburzenia mineralizacji) [2, 3].

Osteoporoza, uznana za chorobę cywilizacyjną, w myśl definicji Światowej Organizacji Zdrowia z 1994 r. jest „układową chorobą szkieletu, charakteryzującą się niską masą kości, upośledzoną mikroarchitekturą tkanki kostnej i w konsekwencji zwiększoną jej łamliwością i podatnością na złamania” [4]. Natomiast NIH (National Institutes of Health, USA) definiuje osteoporozę jako „chorobę szkieletu, charakteryzującą się rosnącym ryzykiem złamań kości w następstwie obniżania się jej odporności mechanicznej” [5]. W związku z wagą problemu, w styczniu 2000 roku w siedzibie WHO, w Genewie, oficjalnie proklamowano „Dekadę Kości i Stawów 2000-2010 r.”. Zgodnie z podanymi wówczas danymi prognostycznymi, co trzecia kobieta i jeden na dwunastu mężczyzn po 50 roku życia będą chorowali na osteoporozę. Wiadomo, że nie leczona choroba prowadzi do złamań i w konsekwencji do kalectwa, stając się problemem społecznym znacząco obciążającym budżet państwa (np. rocznie w USA leczenie osteoporozy kosztuje około \$ 18 bilionów) [6-8].

Szacuje się, że w Polsce na osteoporozę choruje około 2,8 mln ludzi, w tym ok. 25% kobiet i 13% mężczyzn po 60. roku życia, a ryzyko złamania u 50 - letniej kobiety wynosi prawie 40%. Koszty leczenia osteoporozy ustępują jedynie wydatkom wynikającym z terapii chorób układu sercowo – naczyniowego [9]. Niewątpliwie, więc, osteoporoza jest problemem natury społeczno – ekonomicznej budzącym zainteresowanie naukowców oraz klinicystów.

Tkanka kostna jest zróżnicowaną tkanką łączną, charakteryzującą się dużą wytrzymałością i wysoką aktywnością metaboliczną. Dzięki tym właściwościom pełni ona rolę mechaniczną – stanowi „rusztowanie” dla organizmu, funkcję ochronną dla narządów wewnętrznych, a także krwiotwórczą. Tkanka kostna stanowi ponadto rezerwuar związków mineralnych, przede wszystkim wapnia (99% tego pierwiastka w ustroju zdeponowane jest w tkance kostnej) i fosforanów [10].

Wyróżnia się dwa typy tkanki kostnej – korową (zbitą) oraz beleczkowatą (gąbczastą). Kość korowa charakteryzuje się wysoką wytrzymałością mechaniczną. Kość beleczkowatą, natomiast, wyróżnia blisko ośmiokrotnie większa od kości korowej aktywność metaboliczna. W związku z tym, w jej obrębie najwcześniej będą widoczne zarówno zmiany patologiczne dotyczące metabolizmu kostnego, jak również efekty prowadzonego leczenia [11].

Przebudowa kości odbywa się praktycznie przez całe życie osobnicze i opiera się na dwóch przeciwstawnych procesach - tworzeniu i resorpcji kości. Pierwszy z nich zależy od aktywności osteoblastów – komórek wywodzących się z mezenchymalnych komórek szpiku kostnego. Za niszczenie kości odpowiedzialne są, natomiast, osteoklasty – wielojądrowe komórki wywodzące się z macierzystej komórki hematopoetycznej [12]. W okresie wzrostu organizmu lub podczas procesów adaptacyjnych (np. po urazach) dominuje synteza tkanki kostnej, dzięki czemu możliwe są właściwy wzrost i kształtowanie kości. Proces ten nazywany jest modelacją (ang. modeling) [13, 14]. Natomiast, trwająca całe życie przebudowa wewnętrzna kości - remodelacja (ang. remodelling) ma charakter ciągły, odbywa się w ściśle określonych miejscach kości i zapewnia utrzymanie masy kostnej szkieletu i homeostazy wapniowo- fosforanowej [13, 14].

Dzięki sprzężeniu procesów resorpcji i tworzenia, dochodzi do usuwania starej i tworzenia w jej miejsce nowej kości. W ten sposób odbywa się wymiana tkanki kostnej i jej funkcja utrzymywana jest na właściwym poziomie. Zaburzenie równowagi między tymi dwoma procesami może, w efekcie, doprowadzić do nadmiaru masy kostnej –

osteopetrozy lub jej ubytku – ostopenii, a nawet osteoporozy [15]

Siła i strukturalna wytrzymałość kości zależą od jej gęstości (BMD - bone mineral density). Szczytowa masa kostna (PBM – peak bone mass) osiągana jest w pierwszych trzech dekadach życia – odpowiednio ok. 50%, 40% i 10%, a po tym okresie każdego roku dochodzi do utraty ok. 1% masy kostnej [16]. Na osiągnięcie szczytowej masy kostnej wpływa wiele czynników: predyspozycja genetyczna, aktywność fizyczna, stan hormonalny organizmu (dojrzewanie płciowe, hormonalna terapia zastępcza), odżywianie, dostępność składników mineralnych w diecie oraz narażenie na czynniki szkodliwe (tytoń, alkohol, doustna antykoncepcja hormonalna) [17]. Tym samym, oczywisty jest fakt, że to właśnie w okresie dzieciństwa i dojrzewania konieczne jest zapewnienie jak najlepszych warunków dla rozwoju tkanki kostnej. Dlatego, niezmiernie istotne, z punktu widzenia klinicznego, jest dokładne poznanie etapów i czynników regulujących te procesy.

Wykazano, że do zainicjowania różnicowania komórek hematopoetycznych w kierunku osteoklastów niezbędny jest ich bezpośredni kontakt z innymi komórkami tkanki kostnej – komórkami zrębu lub osteoblastami [18, 19]. Znanych jest wiele cytokin i hormonów w sposób pośredni inicjujących osteoklastogenezę. Komórkami docelowymi dla tych czynników są właśnie komórki zrębu / linii osteoblastów. Badania dowiodły, że bez względu na rodzaj czynnika inicjującego oraz drogę transdukcji sygnału (udział między innymi: cyklicznego adenozyno-monofosforanu (cAMP - Cyclic adenosine monophosphate) [20], glikoproteiny gp130, czynnika hamującego białaczkę (LIF - leukemia inhibitory factor), onkostatyny M (OSM) [21]) wspólnym etapem ich działania jest ekspresja genów dla białka błonowego, określanego jako czynnik różnicowania osteoklastów – ODF – osteoclast differentiation factor [18]. Jest on niezbędny w kolejnych stadiach dojrzewania osteoklastów, począwszy od różnicowania się komórki pnia w kierunku linii makrocytarno – makrofagalnej [18].

Identyfikacja ODF, wraz z odkryciem kolejnych glikoprotein, pozwoliła na spojrzenie w nowym świetle na zagadnienie metabolizmu tkanki kostnej [22].

Wyniki prowadzonych badań wskazują, że w procesie właściwego dojrzewania i funkcjonowania osteoklastów ogromną rolę odgrywa szlak, którego głównymi elementami są osteoprotegeryna (OPG - ang. osteoprotegerin), receptor aktywujący jądrowy czynnik kappa B (RANK - ang. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) oraz ligand dla RANK (RANKL - ang. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand) [23, 24].

Osteoprotegeryna została odkryta w 1997 roku przez trzy niezależne grupy badawcze. *Simonet i wsp.*, w trakcie sekwencjonowania cDNA jelita szczurów, zidentyfikowali białko o nieznanym wówczas funkcji, wykazujące wysoką homologię z rodziną receptorów dla czynnika martwicy guzów - TNFR (ang. Tumor necrosis factor receptor) [25]. Wkrótce okazało się, że jest ono identyczne z białkiem hamującym aktywność osteoklastów w medium ludzkich fibroblastów zarodkowych, czyli czynnikiem hamującym osteoklastogenezę (OCIF - osteoclastogenesis inhibitory factor) [26], z receptorem pochodzącym z komórki dendrytycznej grudki (FDCR-1 - follicular dendritic cell-derived receptor-1) [27] oraz z molekułą hamującą osteoklastogenezę i resorpcję kości - TR1 (TNF - receptor -like-molecule-1) [28].

Tsuda i Wong, w badaniach na myszach, wykazali, że biologiczna funkcja OPG może wiązać się ze zwiększeniem tworzenia kości lub z hamowaniem jej resorpcji. U zwierząt doświadczalnych obserwowany niemal całkowity brak osteoklastów sugerował, że właśnie ta linia komórkowa jest punktem docelowym działania badanego białka. Jego ochronna rola dla kości była podstawą do nadania mu nazwy: osteoprotegeryna, a według międzynarodowej nomenklatury TNF: TNFRSF11B [29, 30].

Białko to należy do nadrodziny receptorów TNF (TNFR) i jest do tej pory jedynym znanym pierwotnie rozpuszczalnym receptorem dla TNF [25, 31].

Badania prowadzone na ludziach, myszach i szczurach wykazały duże podobieństwo w budowie strukturalnej osteoprotegeryny u różnych gatunków zwierząt. Dowodzi to wysokiego stopnia konserwatywności ewolucyjnego tego białka [25].

Osteoprotegeryna zbudowana jest z 401 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 55 kDa, a geny ją kodujące występują u człowieka w chromosomie 8q24. W cząsteczce tej glikoproteiny można wyróżnić strukturalnie trzy grupy aktywnych biologicznie domen. W pierwszej grupie znajdują się cztery domeny bogate w cysteinę (D1-D4), w drugiej - dwie homologiczne z tzw. domenami śmierci (D5-D6) (ang. death domain), a w ostatniej - domena wiążąca proteoglikany (D7). Domeny D1-D4 są odpowiedzialne za wiązanie RANKL, dimeryzację i ich obecność jest wystarczająca do zahamowania osteoklastogenezы. Domeny D5 i D6 uczestniczą w transdukcji sygnału dla apoptozy, zaś D7 umożliwia interakcję, między innymi, z heparyną i syndecanem. Brak hydrofobowej domeny międzybłonowej, stabilizującej białko, nadaje osteoprotegerynie jej unikalnych własności w grupie TNFR – występowanie w formie rozpuszczalnej. Do oznaczania OPG zastosowanie znalazła przede wszystkim metoda

immunoenzymatyczna ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) [32].

Osteoprotegeryna występuje w 3 izoformach: jako monomer i homodimer oraz w kompleksie ze swoim ligandem (RANKL). Dimeryzacja odbywa się wewnątrzkomórkowo i możliwa jest dzięki wytwarzaniu mostków dwusiarczkowych między dwoma cząsteczkami w pozycji Cys 400. Dimer jest formą dominującą *in vivo* i wykazuje największą aktywność biologiczną oraz powinowactwo do RANKL [33]. Ekspresję genu dla osteoprotegeryny wykryto między innymi w komórkach podścieliska szpiku kostnego, komórkach dendrytycznych, limfocytach, fibroblastach, monocytach i makrofagach. Omawiane białko jest wytwarzane niemal przez wszystkie ludzkie tkanki i narządy: kości, szpik kostny, płuca, nerki, serce, żołądek, gruczoł krokowy, łożysko, śledzionę, wątrobę oraz gruczoł piersiowy [25, 27, 34].

Synteza osteoprotegeryny jest regulowana przez wiele czynników. Jej stężenie zwiększa się pod wpływem, między innymi: witaminy D3, estradiolu, transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β), czynnika martwicy guzów alfa (TNF- α), interleukiny-1 (IL-1). Przeciwny efekt wywołują natomiast: parathormon (PTH), białko podobne do parathormonu (PTHrP), glukokortykosterydy (GKS), prostaglandyna E (PGE 2) i in. [35].

W przeprowadzonych badaniach epidemiologicznych oceniano związek między stężeniem OPG a płcią, wiekiem, stężeniem estradiolu oraz z gęstością mineralną kości (BMD) [36-38]. Uzyskane wyniki nie zawsze były jednoznaczne, a niejednokrotnie wręcz sprzeczne. Podczas gdy niektórzy badacze stwierdzili dodatnią zależność między stężeniem OPG a BMD, inni obserwowali korelację ujemną lub nie stwierdzali w ogóle związku między BMD a stężeniem OPG [39, 40]. Kwestia ta nadal pozostaje otwarta.

Prowadzone ponad 20 lat temu badania nad dojrzewaniem, różnicowaniem i aktywacją osteoklastów wskazywały na istnienie czynnika związanego z powierzchnią komórek podścieliska lub/i osteoblastów, niezbędnego do prawidłowego przebiegu osteoklastogenezy. Prowadzone w kolejnych latach badania pozwoliły na identyfikację tego czynnika, który nazwano ligandem dla osteoprotegeryny (OPGL – osteoprotegerin ligand) [26, 29]. Okazał się on być identyczny z naturalnym ligandem dla receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (RANKL – receptor activator of NF-B ligand) [41] oraz z cytokiną TRANCE (tumor necrosis factor - related activation -induced cytokine), oznaczoną jako TNFRSF11A [30, 42]. W celu ujednolicenia nomenklatury powszechnie używana jest nazwa RANKL.

Glikoproteina ta należy do rodziny białek TNF. Gen dla RANKL zlokalizowano w

genomie ludzkim na chromosomie 13q14. Białko zbudowane jest z 317 aminokwasów, ma masę cząsteczkową 45 kDa, w 87% jest identyczne z jego mysim odpowiednikiem. Jest zaliczane do typu drugiego tej grupy protein (rodziny TNF). Zawiera w swojej strukturze domenę kotwiczącą w błonie komórkowej i krótką domenę wewnątrzplazmatyczną, połączoną z częścią korową. Ta druga odpowiada za wiązanie ze swoistymi, bogatymi w cysteinę, receptorami [43].

Ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (RANKL) występuje w postaci trzech izoform jako:

1. pierwotnie związany z powierzchnią komórki,
2. w postaci wolnej (sRANKL), która powstaje w wyniku enzymatycznej aktywności metaloproteinazy TACE (tumor necrosis converting enzyme), po odcięciu od powierzchni komórki w dwóch możliwych miejscach: 140. i 145. sekwencji aminokwasowej oraz
3. molekule wewnątrzplazmatycznej

Największą aktywność biologiczną wykazuje pierwsza z wymienionych izoform [44 - 46].

Ekspresję RANKL stwierdzono na osteoblastach, w obwodowych węzłach chłonnych, wątrobie płodu, komórkach mięsaka kościopochodnego oraz w innych narządach i tkankach [43]. Ekspresja genów jest regulowana zarówno na poziomie transkrypcji jak i na etapie translacji przez wiele związków, między innymi przez: 1,25 dihydroksy D3, czynniki wzrostu i peptydy np.: TGF- β 1, czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), PTHrP, IL-1 β i IL-11 [47-49].

Badania nad rozpuszczalną postacią RANKL wykazały, że wraz z M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) inicjuje on powstawanie osteoklastów z komórek śledziony, nawet bez współdziałania osteoblastów. Proces ten jest całkowicie hamowany przez OPG [22]. *Kong i wsp.* potwierdzili, że RANKL jest czynnikiem niezbędnym w procesie dojrzewania osteoklastów i jednocześnie wykazali jego udział w dojrzewaniu tymocytów [50]. Ujawniono w ten sposób nową aktywność RANKL - w różnicowaniu limfocytów T. *Wong i wsp.*, badając geny regulujące apoptozę limfocytów T wykazali ponadto, że TRANCE *in vitro* hamował apoptozę komórek dendrytycznych, zarówno ludzkich jak i mysich. Zwiększonej przeżywalności komórek dendrytycznych towarzyszyła proliferacja limfocytów T [51]. RANKL, po związaniu z receptorem błonowym RANK, pełni również rolę czynnika chemotaktycznego dla monocytów krwi obwodowej [52].

Podobnie jak w przypadku OPG, do oznaczania stężenia sRANKL w surowicy zastosowanie znalazła przede wszystkim metoda ELISA [171].

W roku 1998 zidentyfikowany zostało kolejne białko należące do rodziny receptorów TNF – receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B (RANK ang. receptor activator of NF- κ B), będący funkcjonalnym receptorem dla RANKL [41].

Ta glikoproteina typu I jest zbudowana z 616 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 90kDa. Geny dla białka ludzkiego zlokalizowano na chromosomie 18q22.1. W budowie RANK wyróżnia się następujące funkcjonalne domeny: począwszy od N-końca łańcucha białkowego - zewnątrzkomórkową, następnie krótki fragment śródbłonowy, dużą wewnątrzplazmatyczną domenę C-końcową, a także sekwencję sygnałową. Receptor ten wykazuje swoistość do łączenia się z RANKL [24, 53, 54].

Ekspresję RANK stwierdzono na powierzchni wielu komórek: linii makrocytarno – makrofagowej, na preosteoklastach i osteoblastach, limfocytach B i T, komórkach dendrytycznych, fibroblastach, tymocytach, chondrocytach, komórkach śródbłonka naczyniowego, wątroby, śledziony a także w innych tkankach. Podobnie jak inne receptory z nadrodziny TNF, po związaniu z właściwym ligandem (RANKL), tworzy funkcjonalny trimer. Trimeryzacja receptora jest niezbędna do uzyskania pełnej dojrzałości osteoklastów [55]. Liczne badania, prowadzone głównie na myszach pozbawionych genów dla RANK i/lub RANKL, potwierdziły kluczową rolę, jaką odgrywa układ RANKL/RANK w różnicowaniu i dojrzewaniu osteoklastów. U tej populacji zwierząt doświadczalnych, mianowicie, obserwowano występowanie osteopetrozy [50, 56]. Inni badacze wykazali, ponadto, że glikoproteiny te mają wpływ na apoptozę już dojrzałych osteoklastów [43].

Powyższe obserwacje wskazują, że w wyniku połączenia RANKL ze swoistym receptorem komórkowym RANK, dochodzi do uruchomienia kaskady zdarzeń i aktywacji genów warunkujących różne procesy w komórce. OPG, będąc naturalnym rozpuszczalnym receptorem dla RANKL (tzw. decoy receptor), kompetycyjnie łączy się z nim i tym samym nie dopuszcza do aktywacji receptora komórkowego. Ponadto, OPG wpływa na okres półtrwania RANKL; jednocześnie RANKL moduluje bioaktywność, internalizację i biodegradację OPG [57, 58].

Spostrzeżenia wielu autorów wskazują, że białka te pełnią istotną rolę nie tylko w chorobach metabolicznych kości, ale również w innych procesach patologicznych [59, 60]. Najwięcej badań nad triadą omawianych glikoprotein dotyczy osób dorosłych;

udowodniono ich udział w chorobach zapalnych, o podłożu immunologicznym [61, 62], w nowotworach [63, 64] i schorzeniach układu sercowo – naczyniowego [49, 65]. W literaturze niewiele jest danych określających wartości referencyjne stężeń omawianych glikoprotein w surowicy osób dorosłych [40, 66]. Brakuje ich również dla grupy w wieku rozwojowym.

Wyników badań dotyczących omawianych glikoprotein, a prowadzonych u ludzi dorosłych, nie da się w prosty sposób ekstrapolować na populację pediatryczną. Jak podaje *Masi i wsp.* stężenie OPG w populacji dziecięcej jest znacząco niższe niż u dorosłych [67]. Mimo iż w ostatnich latach prowadzone są kolejne badania nad osteoprotegeryną i ligandem RANK w populacji dziecięcej, nadal jednak są to pojedyncze doniesienia, a otrzymywane wyniki - dyskusyjne. W kręgu zainteresowań badaczy znalazły się takie schorzenia jak: młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów [33, 68-70], cukrzyca typu I [71], przewlekła niedomoga nerek [70], nerczak zarodkowy [72], histiocytoza z komórek Langerhansa, choroba Kawasaki [73] czy nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) [74].

Szczególnie interesujący wydaje się problem zaburzeń mineralizacji kości w populacji pediatrycznej z nieswoistymi zapaleniem jelit. Klasyczne postaci NZJ rozpoznawane są już u dzieci w wieku przedszkolnym, a nawet u niemowląt [75-77]. Odnotowany w ostatnich latach wzrost zachorowalności na nieswoiste zapalenia jelit w populacji pediatrycznej stanowi silny bodziec do zintensyfikowania badań dotyczących tych jednostek chorobowych.

Nieswoiste zapalenia jelit to grupa pierwotnych, przewlekłych chorób zapalnych przewodu pokarmowego, obejmująca wrzodziejące zapalenie jelita grubego (wzjg), chorobę Leśniowskiego - Crohna (ch.L-C) oraz inne, rzadziej występujące, niespecyficzne zapalenia jelit: mikroskopowe zapalenie jelit - kolagenowe i limfocytarne, eozynofilowe zapalenie przewodu pokarmowego, choroba Behceta, zapalenie zbiornika jelitowego Poucha (pouchitis) oraz wrzód samotny odbytnicy [78-82].

Nieswoiste zapalenia jelit występują praktycznie we wszystkich grupach wiekowych. Szacuje się, że ok. 2% stanowią dzieci poniżej 10 roku życia, zaś 30% to dzieci i młodzież w wieku 10-19 lat [83]. Zachorowalność na poszczególne typy NZJ wśród najmłodszych pacjentów jest różna. *Tanaka i Mamula* stwierdzili częstsze występowanie wzjg, zaś *Reummele* – ch.L-C [75-77]. W Polsce analiza epidemiologiczna dotycząca Pomorza Zachodniego wykazała częstsze występowanie

ch.L-C u dzieci w wieku średnio 8,2 lat; wzjg natomiast częściej stwierdzano u dzieci starszych - 10 letnich [84]. Badania epidemiologiczne ostatnich lat wykazują znaczny wzrost zachorowań na chorobę Leśniowskiego - Crohna, przy dość stałej częstości zachorowań na wrzodziejące zapalenie jelita grubego [85].

Etiopatogeneza tych chorób nadal pozostaje nie w pełni wyjaśniona. W powstawaniu zmian zapalnych w jelitach u pacjentów z NZJ bierze się pod uwagę udział, między innymi, procesów immunologicznych, czynników genetycznych, środowiskowych i bakteryjnych [86-90].

Liczne badania dowodzą, że w przebiegu NZJ dochodzi do zaburzeń regulacji procesów immunologicznych, z przewagą aktywacji limfocytów T o fenotypie CD4+. W zależności od czynnika wywołującego dochodzi do polaryzacji odpowiedzi w kierunku Th1 bądź Th2. W ch.L-C dominują cytokiny związane z Th1: interferon gamma (INF- γ), IL-12. We wzjg natomiast, profil cytokin nie jest tak wyraźny; wydaje się jednak dominować reakcja Th2 - zależna z udziałem IL-10 oraz IL-5 [91]. Obok wyżej wymienionych cytokin, duże znaczenie mają mediatory reakcji zapalnej, takie jak: IL-1 β , TNF- α oraz IL-6 [92].

Na podstawie badań genetycznych stwierdzono, że do wystąpienia wzjg szczególnie predysponowane są osoby z obecnością mutacji w genach chromosomów 2 i 6, zaś do ch.L-C - w obrębie chromosomu 16. Czynniki genetyczne są współodpowiedzialne za pierwotne uszkodzenie błony śluzowej jelita, co prowadzi w efekcie do zmiany jej funkcji. Stwierdzono, że u osobników predysponowanych genetycznie do tych schorzeń zachodzi nieprawidłowa odpowiedź układu odpornościowego. Zmiany zachodzące w bakteryjnej florze jelitowej mają duże znaczenie w inicjacji oraz podtrzymywaniu stanu zapalnego w błonie śluzowej jelita. Szczególną rolę przypisuje się bakteriom redukującym siarkę (SRB - sulphur reducing bacteria) [93-96]. Nie bez znaczenia jest wpływ diety - zwłaszcza obecność dodatków funkcjonalnych do żywności i nadmiernie duże spożycie kwasów tłuszczowych omega - 6 [97].

Obraz kliniczny NZJ jest różnorodny. Do najczęściej obserwowanych objawów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego należą: bóle brzucha, biegunka z zawartością śluzu i krwi w kale. Choroba Leśniowskiego - Crohna u dzieci manifestuje się głównie bólami brzucha, przeważnie ze współistniejącymi objawami ogólnymi np. osłabieniem, nudnościami, zwiększoną ciepłotą ciała. U najmłodszych dzieci - krwawienia z odbytu, niepokój, brak łaknienia i utrata masy ciała dominują w obrazie klinicznym [76, 77].

Zmiany zapalne występować mogą w każdym odcinku przewodu pokarmowego. We

wzjg zapalenie obejmuje ograniczony odcinek przewodu pokarmowego, przeważnie dystalne odcinki jelita - zawsze zajęta jest odbytnica, w 50-54% odbytnica i esica a w 20% całe jelito grube. W ch. L-C proces zapalny obejmuje różne odcinki przewodu pokarmowego - od jamy ustnej aż po odbytnicę. Stwierdza się również objawy spoza układu pokarmowego: zmiany oczne pod postacią zapalenia przedniego odcinka oka; skórne (rumień guzowaty, piodermia zgorzelinowa), stawowe (zapalenia stawów) [90, 98-101].

W diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit zasadnicze znaczenie mają badania endoskopowe. Endoskopia pozwala nie tylko na makroskopową ocenę błony śluzowej przewodu pokarmowego, ale także umożliwia pobranie wycinków błony śluzowej jelita do oceny anatomopatologicznej. W wzjg zmiany mają charakter ciągły, a proces zapalny ograniczony jest do błony śluzowej, podczas gdy w ch. L-C proces zapalny obejmuje wszystkie warstwy ściany przewodu pokarmowego i dotyczy może różnych jego odcinków [102, 103].

Badaniem histopatologicznym we wzjg stwierdza się przede wszystkim zmiany naczyniowe (przekrwienie i wybroczyny), złuszczone komórki nabłonka, obfite nacieki leukocytów, ropnie, zmniejszenie liczby komórek kubkowych, kumulację neutrofilów w świetle cew gruczołowych i formowanie tzw. ropni krypt. W ch.L-C obserwuje się głównie zanik kosmków jelitowych, obecność ziarniaków, hiperplazję grudek chłonnych i zwłóknienia. Obserwuje się także hiperplazję nerwową, polegającą na zwiększeniu liczby pni nerwowych i komórek zwojowych, poszerzenie naczyń limfatycznych, zapalenie drobnych naczyń krwionośnych [95, 103].

Badania laboratoryjne przede wszystkim służą do oceny nasilenia stanu zapalnego (C-reaktywne białko ostrej fazy - CRP, szybkość opadania krwinek czerwonych - OB, liczba białych krwinek, liczba płytek krwi - PLT, stężenie fibrynogenu, obecność krwi utajonej w kale) oraz zaburzeń metabolicznych (np. stężenie w surowicy albuminy, wapnia, fosforanów, żelaza).

Przebieg NZJ ma charakter nawrotowy z różnej długości okresami remisji i nawrotów. W ocenie aktywności procesów znalazły zastosowanie skale – Truelove-Wittsa i PCDAI wg Hyamsa (Pediatric Crohn's Disease Activity Index), odpowiednio dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i dla choroby Leśniowskiego - Crohna, obie w modyfikacji Ryzki i Woynarowskiego [104, 105].

Z uwagi na złożoną, niejasną etiopatogenezę leczenie NZJ ma nadal głównie charakter objawowy i zależy od stopnia nasilenia zmian. W terapii stosuje się, w związku z tym,

przede wszystkim leczenie przeciwzapalne oparte o pochodne kwasu 5-amino-salicylowego (5-ASA), glukokortykosterydy (GKS), a także inne leki immunomodulujące, najczęściej azatioprynę i cyklosporynę [102].

Najnowsze metody terapeutyczne wykorzystują osiągnięcia biologii molekularnej, co daje szansę leczenia przyczynowego. Zastosowanie mają obecnie monoklonalne przeciwciała klasy G1 wiążące TNF- α : chimeryczne mysio-ludzkie – infliximab oraz całkowicie ludzkie – adalimumab. Rzadziej stosowanymi w leczeniu są etanercept oraz certolizumab [106, 107].

W przypadkach, w których farmakoterapia jest nieskuteczna lub występują powikłana np.: perforacja jelita, toksyczne rozszerzenie okrężnicy (megacolon toxicum), przetoki, czy dysplazja komórkowa, istnieją wskazania do leczenia chirurgicznego [108, 109].

Przebieg nieswoistych zapaleń jelit wiąże się z licznymi powikłaniami. Wśród nich występują, między innymi, zmiany w obrębie układu pokarmowego: ropnie, przetoki, szczeliny, niedrożności, choroby wątroby i dróg żółciowych, ale także poza nim: choroby nerek (szczególnie przewlekła niedomoga nerek), zaburzenia rozwoju fizycznego (niedobór masy ciała i wzrostu), zaburzenia hematologiczne (niedokrwistość), zmiany skórne i stawowe (zapalenia stawów), a także onkologiczne – rak jelita grubego [110-112].

Jednym z częstszych objawów towarzyszących nieswoistym zapaleniom jelit, zarówno u dorosłych jak i dzieci, są zaburzenia mineralizacji kości, o nadal niejasnym patomechanizmie powstawania [113-116].

U podłoża tego zjawiska leży z pewnością wiele przyczyn, zarówno wynikających z samej choroby – złe odżywienie, zaburzenia wchłaniania jelitowego i związane z tym niedobory wapnia i witaminy D3, przewlekły stan zapalny, ograniczona aktywność fizyczna, nierzadko opóźnione dojrzewanie płciowe, jak i jatrogennych – głównie efekt uboczny sterydoterapii [117-122].

Glukokortykosterydy, jako leki przeciwzapalne, mają szerokie zastosowanie w leczeniu NZJ. Niemniej, często długotrwała terapia wiąże się z wieloma działaniami niepożądanymi, wśród których znaczące miejsce zajmują zaburzenia mineralizacji kości – osteopenia oraz tzw. posterydowa osteoporoza [123]. Związek między występowaniem zaburzeń mineralizacji kości a dawką kumulacyjną i okresem sterydoterapii oraz czasem trwania choroby nie został jednoznacznie potwierdzony [117, 118]. Istnieją jednak dowody, że glukokortykosterydy zmniejszają transkrypcję OPG w ludzkich osteoblastach i komórkach zrębu szpiku, jednocześnie zwiększają

ekspresję RANKL [124, 125].

Osteopenia, a tym bardziej osteoporoza, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem złamań kości a w konsekwencji z gorszą jakością życia i większą umieralnością osób z zaburzeniami mineralizacji kości [126]. Należy jeszcze raz podkreślić, że jest to problem dotyczący zarówno populacji dorosłych jak i dzieci.

Wytrzymałość / odporność mechaniczna kości jest uwarunkowana gęstością mineralną kości (BMD - bone mineral density) i jakością tkanki kostnej. Gęstość kości wyrażana jest w gramach na jednostkę objętości (cm^3), zaś jakość kości jest wykładnikiem jej mikroarchitektury i obrotu kostnego [5].

Podstawową metodą diagnostyczną w ocenie ryzyka złamań jest pomiar gęstości kości z zastosowaniem absorpcjometrii promieniowania rentgenowskiego o podwójnej wiązce energetycznej (ang. dual X-ray absorptiometry - DXA), densytometria kości.

Światowa Organizacja Zdrowia przyjęła za kryterium rozpoznania osteoporozy u kobiet w okresie pomenopauzalnym wartość tzw. T-score dla BMD poniżej -2,5. O osteopenii zaś mówi się, gdy wskaźnik ten mieści się w zakresie od -1,0 do -2,5 [127]. T-score porównuje wynik pomiaru gęstości mineralnej kości badanej osoby do średniej gęstości mineralnej kości osób w wieku 30-35 lat, kiedy szkielet człowieka osiągnął już szczytową masę kostną (PBM – peak bone mass) [128].

Densytometria, jako metoda bezpieczna i precyzyjna (niska dawka ekspozycyjna promieniowania rentgenowskiego) znalazła również zastosowanie u dzieci. Jednak interpretacja wyników w populacji pediatrycznej jest utrudniona ze względu na trwający wzrost organizmu i nieosiągniętą jeszcze PBM [129, 130]. W związku z powyższym, za punkt odniesienia przyjęto wskaźnik Z-score, który określa o ile odchylen standardowych wynik badanej osoby odbiega od średniej dla osób w tym samym wieku. Wartość Z-score poniżej -2,0 przyjęto za kryterium „niskiej masy kostnej w odniesieniu do równowiekowej grupy kontrolnej” [131]. Mało jest udokumentowanych danych, aby u dzieci wartości Z-score poniżej -1,0 uznać za nieprawidłowe [132].

Rozpoznanie osteoporozy u dzieci wiąże się z pewnymi trudnościami. Ocena BMD, nawet w odniesieniu do wartości Z-score, może być nieadekwatna w przypadku toczącej się choroby wpływającej na wzrost i dojrzewanie kości, jak to ma miejsce w wielu przewlekłych procesach zapalnych, w tym w nieswoistych zapaleniach jelit [114, 120, 133].

Kolejnym aspektem, którego nie można pominąć, jest brak wystarczających danych

potwierdzających związek między BMD a ryzykiem złamań kości u dzieci, a którego istnienie wykazano w populacji dorosłych [134, 135]. Wg. *Bernsteina*, ryzyko złamań kości u pacjentów z NZJ jest nieco większe niż w populacji osób zdrowych. Biorąc to pod uwagę, *Ward* rozważa rozpoznanie osteoporozy u dzieci dopiero po wystąpieniu minimum jednego złamania kości po niewielkim urazie, a nie wyłącznie na podstawie radiologicznie stwierdzonej niskiej masy kostnej [136].

Farmakoterapia, mająca na celu zmniejszenie ryzyka złamań kości, jest stosowana od ponad 10 lat. Opiera się zasadniczo o dwie grupy leków - antykataboliczne oraz anaboliczne. W pierwszej grupie znalazły się, między innymi: estrogeny, dwufosforany, kalcytonina oraz wybiórczo działające modulatory receptorów estrogenowych. Ich działanie antyresorpcyjne na kości polega przede wszystkim na zmniejszeniu obrotu kostnego. Czynniki anaboliczne, takie jak rekombinowany ludzki hormon paratyroidowy, zwiększają wytrzymałość kości i zmniejszają ryzyko złamań poprzez zwiększenie kościotworzenia [137].

Udowodniona rola układu OPG-RANKL-RANK w licznych chorobach metabolicznych i zapalnych tkanki kostnej daje nowe spojrzenie na możliwości terapii tych zaburzeń, z wykorzystaniem leków o nowym mechanizmie działania. Owocem badań i doświadczeń okazały się: rekombinowane OPG i RANK w połączeniu z fragmentami Fc immunoglobuliny IgG (Fc-OPG) oraz przeciwciało anty - RANKL, czyli denosumab [138, 139].

Efekty, tolerancję i bezpieczeństwo osteoprotegeryny w terapii udowodniono w badaniu randomizowanym, z podwójnie ślepą próbą z kontrolą placebo, w którym wzięły udział 52 kobiety po menopauzie. Po podskórnym podaniu pojedynczej dawki (3mg/kg mc) rekombinowanej ludzkiej osteoprotegeryny obserwowano zmniejszenie obrotu kostnego [140].

Denosumab jest całkowicie ludzkim monoklonalnym przeciwciałem, należącym do immunoglobulin klasy IgG₂. Charakteryzuje się wysokim powinowactwem i specyficznością wobec liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B. Denosumab działa podobnie jak natywna osteoprotegeryna. Poprzez związanie RANKL uniemożliwia interakcję liganda z receptorem komórkowym (RANK). Tym samym, zmniejsza się różnicowanie, aktywacja i przeżycie osteoklastów, a więc i resorpcja kości. Denosumab nie wiąże takich molekuł jak TRAIL, TNF- α , TNF- β czy CD-40 [141].

Podobnie do innych ludzkich przeciwciał monoklonalnych, farmakokinetyka

denosumabu nie zależy w sposób liniowy od jego dawki [142]. Ponadto, wykazuje on trwalsze i silniejsze właściwości antyresorpcyjne niż równoważne dawki Fc-OPG [138].

W badaniach klinicznych I fazy - randomizowanych, z podwójnie ślełą próbą kontrolowaną z placebo, przeprowadzonych u zdrowych kobiet w wieku pomenopauzalnym wykazano, że podanie jednej dawki Fc-OPG i denosumabu powodowało gwałtowne, odwracalne i zależne od dawki zahamowanie resorpcji kości [138, 139]. W badaniu klinicznym II fazy u kobiet z obniżoną BMD, obserwowano wzrost gęstości mineralnej kości w wyniku stosowanej terapii denosumabem. Nie opisywano poważnych działań niepożądanych terapii, a te, które wystąpiły, były podobne do stwierdzanych w grupie z placebo [143].

Aktualnie trwają badania III fazy, mające na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa denosumabu w leczeniu kobiet w okresie menopauzalnym z osteoporozą, w prewencji dalszej utraty masy kostnej u kobiet z osteopenią, w zapobieganiu utraty masy kostnej u kobiet z rakiem piersi (bez przerzutów i w trakcie terapii inhibitorami aromataz) oraz w prewencji osteoporozy u mężczyzn z rakiem gruczołu krokowego w trakcie terapii antyandrogenowej [144].

Byrne z kolei przeprowadził badanie na doświadczalnych myszach z zapaleniem jelit oraz współwystępującymi zaburzeniami mineralizacji kości. Wykazał, że podanie Fc-OPG wpłynęło na poprawę stanu mineralizacji kości, jednak nie miało związku z procesem zapalnym toczącym się w jelicie [145].

Obserwując szybki postęp medycyny, wydaje się nieuniknione, że kolejnym krokiem mogą być próby zastosowania nowych leków w prewencji i leczeniu osteoporozy u dzieci. Pojawiają się jednak pytania: jaką grupę dzieci należy leczyć, jakie są optymalne: forma, czas i długość terapii oraz jej wpływ na wciąż dojrzewający organizm.

Biorąc pod uwagę ewentualne nowe metody terapeutyczne, nie wolno zapominać o znaczeniu OPG w procesach zapalnych oraz nowotworzeniu. Należy rozważyć, czy ingerencja w układ OPG-RANKL-RANK nie będzie miała negatywnych skutków w tych aspektach.

Udowodniona jest rola triady OPG-RANKL-RANK w układzie immunologicznym, a tym samym możliwy jest jej udział w patogenezie nieswoistych zapaleniach jelit (NZJ) [146]. Korzystając z metody RT-PCR wykazano, że w biopsjach błony śluzowej okrężnicy obecne były produkty transkrypcji RANK, RANKL i OPG, a stężenie OPG

korelowało z cytokinami pro- i przeciwzapalnymi. Na komórkach błony śluzowej jelita i, w mniejszym stopniu, komórkach warstwy podśluzowej stwierdzono ekspresję OPG, RANKL i RANK [74].

Tym większe znaczenie ma dokładne poznanie roli triady osteoprotegeryna - receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B i jego ligand w patologii układu kostnego u dzieci. Być może prowadzone w kolejnych latach badania dotyczące tej problematyki przyczynią się do opracowania nowych możliwości w zakresie technik diagnostycznych i zweryfikują stosowane obecnie, jeszcze nie w pełni doskonałe, metody terapeutyczne nieswoistych zapaleń jelit u dzieci.

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była:

1. Ocena występowania zaburzeń mineralizacji kości u dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit
2. Ocena związku między stężeniem osteoprotegeryny i stężeniem liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B a występowaniem zaburzeń mineralizacji tkanki kostnej u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.
3. Analiza czynników modulujących stężenia osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B u dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit.
4. Ocena przydatności diagnostycznej oznaczania osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B, jako pośrednich wykładników stanu zapalnego, w porównaniu z powszechnie uznanymi wskaźnikami stanu zapalnego: białkiem C-reaktywnym, szybkością opadania krwinek czerwonych.
5. Rozważenie możliwości ingerencji w układ osteoprotegeryna - ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w aspekcie terapii nieswoistych zapaleń jelit i zaburzeń metabolizmu kostnego.
6. Próba określenia wartości referencyjnych stężenia osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy dzieci zdrowych.

3. PACJENCI I METODY

Badaniem objęto 93 dzieci, w tym 36 dziewcząt (38,7%) i 57 chłopców (61,3%) w wieku od 4,08 do 18 lat (średni wiek dzieci wynosił $13,66 \pm 3,8$ lat; mediana 17,7 lat).

Badanych podzielono na trzy grupy:

- grupa I - 18 dzieci chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (wzjg). W grupie tej znajdowało się 16 chłopców i 2 dziewczynki w wieku od 4,08 lat do 18 lat (średnio $14,80 \pm 3,9$ lat, mediana 17 lat)
- grupa II - 24 dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (ch.L-C), 11 dziewczynek i 13 chłopców w wieku od 5 lat do 18 lat (średnio $14,7 \pm 3,6$ lat, mediana 16 lat)
- grupa III - kontrolna - 51 dzieci zdrowych, w tym 23 dziewczynki i 28 chłopców w wieku od 4,41 lat do 17,75 lat (średnio $12,9 \pm 3,84$ lat, mediana 14,7 lat).

Pacjenci z grupy I i II byli leczeni w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od 2006 do 2008 roku. Dzieci z grupy III były hospitalizowane w Klinice Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w tym samym czasie.

Dzieci z grupy III, kontrolnej, przebywały w Klinice z powodu: upojenia alkoholowego, po lekkim urazie (np. uraz głowy z otarciem naskórka), zabiegu operacyjnego w ramach chirurgii plastycznej. Zarówno w badaniu podmiotowym jak i przedmiotowym nie stwierdzono w tej grupie dzieci cech ostrej choroby infekcyjnej ani żadnej choroby przewlekłej.

Wszystkie badania były przeprowadzone po uzyskaniu pisemnej zgody rodziców/opiekunów prawnych dzieci oraz pacjentów, którzy ukończyli 16 rż. Zostali oni poinformowani o celu i założeniach pracy.

Formularze zgody na przeprowadzenie badań umieszczono w Ankesie.

Na wykonanie powyższych badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku Nr 406/2006.

Analizie retrospektywnej poddano dane uzyskane z badania podmiotowego (informacje od pacjentów i ich rodziców) oraz z dokumentacji medycznej (historie choroby).

U wszystkich dzieci przeprowadzono badanie pediatryczne podmiotowe, przedmiotowe oraz dodatkowe badania laboratoryjne, a u chorych dzieci również densytometrię odcinka lędźwiowego kręgosłupa.

W badaniu podmiotowym zwracano szczególną uwagę na:

- występowanie chorób o podłożu immunologicznym
- występowanie dolegliwości bólowych i / lub złamań kości
- przyjmowanie leków immunosupresyjnych i hormonalnych, w tym sterydowych, niezwiązanych z leczeniem nieswoistych zapaleń jelit
- styl życia ze szczególnym uwzględnieniem: diety, aktywności fizycznej, palenia tytoniu
- wywiad rodzinny w kierunku występowania osteoporozy.

W ramach badania przedmiotowego wykonano pomiary antropometryczne (masa ciała i wzrost). Na ich podstawie wyliczono wskaźnik masy ciała (body mass index - BMI) oraz współczynnik Cole'a (CI - Cole Index), wyrażony w procentach [147].

Wzór, według którego obliczano wskaźnik masy ciała (BMI)

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

Wzór, według którego obliczano współczynnik Cole'a (CI)

$$\text{Współczynnik Cole'a (\%)} = (\text{masa ciała} \times \text{długość standardowa ciała}^2 / \text{standardowa masa ciała} \times \text{długość ciała}^2) \times 100$$

W oparciu o współczynnik Cole'a oceniano stan odżywienia dzieci, wg. klasyfikacji Mc Larena.

Klasyfikacja Mc Larena:

- CI : >120% : otyłość
- CI: 110 - 120% : nadwaga
- CI: 90 - 110% : norma
- CI: 85 - 90% : łagodne niedożywienie
- CI: 75- 85% : umiarkowane niedożywienie
- CI: <75% : ciężkie niedożywienie

Badania dodatkowe

U wszystkich badanych dzieci w badaniach laboratoryjnych oznaczono:

- Stężenie osteoprotegeryny (OPG)

- Stężenie liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (sRANKL)

U dzieci chorych z grupy I i II oznaczono również:

- Morfologię krwi ze wzorem odsetkowym krwinek białych
- Szybkość opadania krwinek czerwonych (OB)
- Stężenie białka reaktywnego C (CRP), fibrynogenu, żelaza (Fe), wapnia (Ca) i albuminy w surowicy krwi
- Obecność krwi utajonej w kale

Badanie morfologii krwi, wraz ze wzorem odsetkowym krwinek białych, OB, stężenia: fibrynogenu, CRP, żelaza, albuminy, wapnia, fosforanów w surowicy krwi przeprowadzone były metodami tradycyjnymi

Test jakościowy na obecność krwi utajonej w kale wykonano w oparciu o metodę immunochromatograficzną.

Wymienione badania wykonano w Laboratorium Medycznym BRUSS. Przeprowadzono je w ramach rutynowych badań kontrolnych u każdego pacjenta. Dodatkowo pobierano 5 ml krwi, w celu oznaczenia stężenia badanych cytokin. Krew była odwirowywana w ciągu 30 minut od momentu pobrania (czas wirowania: 10 minut, ilość obrotów: 3 tysiące/min), a następnie surowicę mrozono i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu wykonywania oznaczeń, nie dłużej jednak niż 6 miesięcy.

U wszystkich 42 dzieci chorych z NZJ - grupa I i II, w ramach wcześniej przeprowadzonej diagnostyki, wykonano badanie endoskopowe dolnego odcinka przewodu pokarmowego (kolonoskopia pełna, w sedacji). Podczas badania pobierano wycinki błony śluzowej jelita do badania histopatologicznego. Badania wykonywano aparatami firmy Olympus, PCF 160 AF, CFV-1, PCF 20.

Rozpoznanie choroby postawiono w oparciu o obraz kliniczny, endoskopowy a także wynik badania anatomopatologicznego. Do analizy zakwalifikowano jedynie tych chorych, u których rozpoznanie nie budziło wątpliwości.

Do oceny aktywności klinicznej choroby u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykorzystano skalę Truelove - Wittsa w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego. Aktywność kliniczną choroby Leśniowskiego - Crohna oceniano w oparciu o skalę PCDAI (*Pediatric Crohn's Disease Activity Index*) w modyfikacji Woynarowskiego i Ryżki. Skale te przedstawiono w tabelach 1 i 2 [105].

Tab. 1. Skala Truelove-Wittsa w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego

| Oceniany parametr | Natężenie/wartość | Punktacja |
|------------------------------------|-------------------|-----------|
| Temperatura ciała (°C) | Prawidłowa | 0 |
| | 37 °C-38°C | 1 |
| | >38 °C | 2 |
| Stolce biegunkowe (liczba na dobę) | 0-2 | 0 |
| | 2-6 | 1 |
| | 6 | 2 |
| Współczynnik Cole'a (%) | >85 | 0 |
| | 80-85 | 1 |
| | >85 | 2 |
| Krew w stolcu | Nie stwierdza się | 0 |
| | Ślad | 1 |
| | Dużo | 2 |
| Stężenie hemoglobiny (g/dl) | >12 | 0 |
| | 10-12 | 1 |
| | <10 | 2 |
| OB (mm/godzinę) | <10 | 0 |
| | 13-30 | 1 |
| | >30 | 2 |

Aktywność choroby Leśniowskiego - Crohna:

0-4 pkt. – postać łagodna

5-8 pkt. – postać o umiarkowanej aktywności

9-12 pkt. – ciężka postać choroby.

Tab. 2. Skala PCDAI w modyfikacji Ryżki i Woynarowskiego

| Oceniany parametr | Natężenie/wartość | Punktacja |
|-------------------|-------------------|-----------|
| Samopoczucie | Dobre | 0 |

| | | |
|--|--|-----|
| | Średnie | 5 |
| | Złe | 10 |
| Bóle brzucha | Nie występują | 0 |
| | Słabe | 5 |
| | Silne | 10 |
| Stolce- ilość, jakość (dziennie) | <2, bez domieszki krwi | 0 |
| | 2-5 luźne lub z domieszką krwi | 5 |
| | >5 lub ze znaczną ilością krwi | 10 |
| Badanie palpacyjne jamy brzusznej | Nie stwierdza się tkliwości ani oporów | 0 |
| | Nieznaczna tkliwość lub badalny guz | 5 |
| | Znaczna tkliwość lub guz | 10 |
| Zmiany okołodbytnicze | Nie stwierdza się | 0 |
| | Niewielkie, niebolesne | 5 |
| | Obecne przetoki, ropnie, bolesność | 10 |
| Objawy pozajelitowe (temperatura ciała >38 °C, zapalenie skóry, stawów, jamy ustnej) | Nie występują | 0 |
| | Jeden objaw | 5 |
| | Dwa lub więcej | 10 |
| Stężenie hemoglobiny (g/dl) | >12 | 0 |
| | 10-12 | 2,5 |
| | <10 | 5 |
| OB (mm/godzinę) | <20 | 0 |
| | 20-50 | 2 |
| | >50 | 5 |
| Stężenie albuminy (g/l) | >35 | 0 |
| | 31-35 | 5 |
| | <31 | 10 |
| Współczynnik Cole'a (%) | >85 | 0 |
| | 80-85 | 10 |
| | <75 | 20 |

Aktywność wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

0-10 pkt. – brak aktywności

11-25 pkt. – postać łagodna

26-50 pkt. – postać o umiarkowanej aktywności

>51 pkt. – ciężka postać choroby

Ostatecznie, do badania zakwalifikowano jedynie tych pacjentów, którzy spełniali poniższe kryteria włączenia do badania:

- Jednoznaczna diagnoza, nie budząca wątpliwości w żadnej z zastosowanych metod diagnostycznych
- Rzetelnie udokumentowane, wiarygodne leczenie farmakologiczne (grupa i dawki leków, okres leczenia, „compliance” ze strony pacjenta).

Kryteriami, których spełnienie uznano za wykluczające z badania były:

- Dodatni wywiad osobniczy lub rodzinny w kierunku: chorób o podłożu immunologicznym, chorób układu kostno – szkieletowego w tym złamania kości, osteoporoza oraz inne, poza NZJ, choroby przewlekłe
- Dodatni wywiad osobniczy w kierunku palenia tytoniu
- Dodatni wywiad osobniczy w kierunku przewlekłego leczenia, glukokortykosterydami wziewnymi, lekami immunomodulacyjnymi, hormonalnymi i przeciwzapalnymi, innymi niż wynikające ze stosowanej terapii nieswoistych zapaleń jelit.

Analiza stosowanego leczenia

U wszystkich pacjentów przeanalizowano stosowane dotychczas leczenie nieswoistych zapaleń jelit, od chwili jego rozpoczęcia do dnia badania. Obliczono kumulacyjne dawki leków przeciwzapalnych i immunosupresyjnych: pochodnych kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA), glukokortykosterydów (GKS), azatiopryny (AZA).

Terapię glukokortykosterydami analizowano w trzech aspektach: łączna dawka leków, całkowity czas sterydoterapii oraz średnia dzienna dawka leku. Leczenie preparatami o działaniu ogólnoustrojowym wyrażono jako równoważne miligramom prednizolonu. Oddzielną analizę przeprowadzono dla budezonidu, który uważany jest za GKS o mniej nasilonym działaniu ogólnoustrojowym [148]. Również niezależnie oceniano GKS podawane miejscowo w postaci wlewk lub czopków doodbytniczych.

W przypadku leczenia cyklosporyną (CsA) nie wyliczano kumulacyjnej dawki, gdyż terapia u każdego pacjenta była zindywidualizowana - monitorowana stężeniem leku w

surowicy krwi i modyfikowana w celu utrzymania stężenia terapeutycznego (tj. 100-150 mg/ml).

Jednocześnie określono długość kuracji (w dniach) poszczególnymi lekami.

Uwzględniono ponadto leczenie żywieniowe: kompletne pozajelitowe (TPN – total parenteral nutrition) i dojelitowe, przez zgłębnik dożołądkowy (NGT – naso-gastral tube).

Analizie poddano także zastosowane u pacjentów leczenie biologiczne – infliximabem.

Oznaczanie stężenia OPG w surowicy

Stężenia osteoprotegeryny w surowicy oznaczono w oparciu o metodę immunoenzymatyczną (ELISA ang. enzyme-linked immunoabsorbent assay) w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku, z zastosowaniem gotowych zestawów do ilościowego oznaczenia osteoprotegeryny firmy Biomedica (Austria numer katalogowy: BI-20402), ściśle według zaleceń producenta.

Objętość krwi konieczna do wykonaniu testu wynosi 50 mikrolitrów. Pobraną próbkę krwi odwirowano a uzyskaną surowicę zamrożono w temperaturze -70°C i przechowywano do chwili wykonania oznaczeń. Do wykonywania oznaczeń surowice rozmrożono do temperatury pokojowej. Test wykonany był techniką opłaszczonych płytek. Do dołków płytek opłaszczonych przeciwciałem przeciw osteoprotegerynie (przeciwciała ludzkie, monoklonalne), dodano kolejno 100 μl buforu testowego, oraz 50 μl standardów, surowicy pacjentów z NZJ (grupa I i II) i surowicy dzieci z grupy III (kontrolnej). Następnie dodano roztwór poliklonalnych przeciwciał przeciw-OPG znakowanych biotyną, prowadząc do powstania kompleksu immunologicznego: osteoprotegeryna - przeciwciało przeciwko osteoprotegerynie. Po delikatnym wymieszaniu, przeprowadzono 24 godziną inkubację w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Następnie płytki dokładnie przepłukano buforem celem usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie do dołków dodano 200 μl koniugatu, streptowidyny-HRPO i ponownie inkubowano, tym razem w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) przez 1 godzinę. Następnie powtórzono procedurę przemywania. Dodano 200 μl roztworu substratu, do każdego dołka, po czym po 20 minutach inkubacji w ciemności, w tej samej temperaturze, co poprzednio, reakcję zatrzymano.

Oznaczanie sRANKL w surowicy.

Do ilościowego oznaczenia sRANKL zastosowano, ściśle z zaleceniami producenta,

gotowe zestawy firmy Biomedica (Austria numer katalogowy: BI-20422H).

W teście wykorzystana jest technika opłaszczonych płytek. Do dołków płytek opłaszczonych osteoprotegeryną (receptorem dla RANKL), dodano 100µl standardów, surowicy pacjentów z NZJ (grupa I i II) i surowicy dzieci z grupy III (kontrolnej), a następnie 100µl roztworu znakowanych biotyną przeciwciał przeciw-sRANKL. Po delikatnym wymieszaniu, poddano 24 godzinnej inkubacji w temperaturze ok. +6⁰C, prowadząc do powstania kompleksu immunologicznego – osteoprotegeryna - ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B. Następnie płyn usuwano z dołków i dokładnie wypłukano je rozcieńczonym buforem, po czym naniesiono 200µl koniugatu (streptowidyna-HRPO). Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (ok. 20⁰C) przez 1 godzinę dołki ponownie wypłukano i osuszono. Następnie do każdego z nich dodano 200µl roztworu substratu i po 30 minutach inkubacji w ciemności w tej samej temperaturze, co poprzednio, reakcję zatrzymano.

Następnie wykonano oznaczenia na aparacie Eliza-Mat 3000, przy długości fali głównej 450nm i referencyjnej 620nm, opierając się o fakt, że intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia oznaczanej substancji.

Wartości zmierzonej absorbancji próby ślepej odjęto od wszystkich pozostałych absorbancji. Krzywą kalibracyjną wykreślono na podstawie wartości standardów z wykorzystaniem programu komputerowego. Z krzywej kalibracyjnej odczytano stężenia cytokin w badanych próbkach.

Według podanych przez producenta informacji, poziom detekcji testu wynosi 0,08 pmol/l, a zakres wartości referencyjnych jest szeroki od 0-6 pmol/l.

Zgodnie z zaleceniem producenta wyznaczono zakres norm stężenia OPG i sRANKL w laboratorium, w którym przeprowadzono oznaczenia.

Materiał biologiczny do wykonanych oznaczeń był pobierany w ramach pobierania krwi do badań niezbędnych w ramach prowadzonej diagnostyki i leczenia.

Ocena gęstości mineralnej kości (BMD)

Badania densytometryczne kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa wykonano aparatem Lunar w Fundacji Budowy i Rozwoju Ośrodka Reumatologicznego Centrum Reumatologii i Osteoporozy w Gdyni.

Badanie przeprowadzono nieinwazyjną metodą techniki absorpcjometrii podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego (dual energy X-ray absorptiometry – DXA). Jest to metoda łatwa w zastosowaniu, w której dawka napromienienia jest minimalna

(ok.1 milirema). Absorbjometria rentgenowska opiera się na pomiarze stopnia pochłaniania energii fotonów emitowanych przez lampę rentgenowską przez badany obszar szkieletu. W badaniu DXA przez źródło promieniowania emitowane są dwie wiązki fotonów o wysokiej i niskiej energii. Pierwsza pochłaniana jest w podobnym stopniu przez tkankę kostną i tkanki miękkie, podczas gdy fotony o małej energii silniej absorbowane są przez kość. Tym samym, znając absorpcję obu wiązek możemy określić, jaka część promieniowania została zaabsorbowana w kości, co umożliwia zróżnicowanie kości od tkanek miękkich.

Densytometr rejestruje ilość gramów wapnia przypadającą na 1 cm² prześwietlonej powierzchni. Na tej podstawie oblicza się tak zwaną powierzchniową gęstość kostną (wyrażaną w gramach na centymetr kwadratowy; ang. bone mineral density - BMD). Wartość ta określana jest jako – BMD - gęstość mineralna kości. Mnożąc BMD przez powierzchnię badanego obszaru kości uzyskujemy zawartość mineralną kości – BMC (ang. bone mineral content).

W niniejszej pracy pomiar BMD dotyczył czterech kręgów lędźwiowych od L1 do L4. Oceniono również średnią wartość dla wszystkich czterech badanych kręgów tego odcinka kręgosłupa. Uzyskane wartości odniesione zostały do funkcjonujących dla populacji pediatrycznej norm polskich, opracowanych przez Lorenca [153]. Wyrażono je jako wartość bezwzględną a także jako odchylenie standardowe Z-score i odsetek wartości należnej dla danej płci i wieku. W sytuacji, gdy wiek metrykalny nie był zgodny z wiekiem kostnym, ocenionym na podstawie RTG lewego nadgarstka, do porównania przyjęto faktyczny wiek kostny dziecka.

Zgodnie z definicją WHO i ISCD przyjęto, że gdy BMD Z - score wynosi mniej niż - 2,0 gęstość kości określana jest jako poniżej oczekiwanej wartości dla wieku. Wartość BMD Z-score powyżej -2,0 określa się jako „ w granicach wartości oczekiwanej dla wieku”.

Metody statystyczne

Materiał badawczy został skategoryzowany według obowiązujących standardów merytorycznych i procedur statystycznych opisanych w kolejnych rozdziałach. Empiryczne wielkości pomiarów cech zostały poddane analizie statystycznej w podgrupach uzyskanych w wyniku tej klasyfikacji. Analiza statystyczna obejmowała analizę opisową i decyzyjną. W skład analizy opisowej weszły prezentacje graficzne i liczbowe otrzymanych wyników. W prezentacji graficznej podano empiryczną oceną

wartości oczekiwanej badanej cech wraz z zaznaczeniem granic 95% przedziałów ufności. W opisie charakterystyk jakościowych stosowano tablice kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego.

Jako miarę położenia przyjęto średnią i pięć nieparametrycznych charakterystyk Tukey'a (minimum, kwartył 25%, mediana, kwartył 75% i maksimum). W niektórych przypadkach wartości tych statystyk przedstawiono na wykresach skrzynkowych. Jako miarę rozrzutu przyjęto odchylenie standardowe. Zastosowane zostały standardowe oznaczenia przejmując, że $Q\alpha$ jest kwantylem rzędu α (wyrażone w %), Min i Max oznacza odpowiednio minimum i maksimum. Oznaczenie N zarezerwowano dla liczebności grupy lub podgrupy. Wartości statystyk opisowych i z podziałem na grupy badawcze zaprezentowano w tabelach lub w formie prezentacji graficznej

W zakresie statystycznej analizy decyzyjnej stosowano testy statystyczne. W pierwszym etapie przeprowadzono weryfikację zgodności rozkładu badanych cech z rozkładem gaussowskim. We wszystkich przypadkach przeprowadzono test Kołmogorowa i hipoteza o normalności rozkładu na ogół została odrzucona. W jednym przypadku (zmienna OPG) nie było podstaw od odrzucenia hipotezy. Stąd decyzje o różnicy innych miar położenia były podejmowane na bazie statystyk nieparametrycznych, głównie stosowany był test (mediany) U Manna-Whitneya. W przypadku analiz OPG zastosowano test t-Studenta. W przypadku analizy porównawczej BMI stosowane testy nie pozwalały na decyzję o wskazaniu różnicy BMI w grupie badawczej i kontrolnej. Przedstawione zostały histogramy BMI w obu grupach i zwrócono uwagę na różnicę w kurtozie¹ i skośności² tych histogramów. Nie jest to wniosek decyzyjny, ale pozwalający na daleko idące przeświadczenie o dokładniejszej analizie tych zmiennych, pozwalającej na precyzyjne decyzje statystyczne.

W zakresie tablic wielozmiennych zawsze najpierw była testowana hipoteza niezależności za pomocą dokładnego testu Fishera, a następnie testu χ^2 . (Pearson Chi-square). Na stosowanie testu χ^2 nałożone są pewne metodologiczne ograniczenia i

¹ Miara koncentracji rozkładu, iloraz czwartego momentu centralnego i kwadratu wariancji. Dla rozkładu normalnego standardowego kurtoza wynosi 3. Zwykle odejmuje się tę wartość 3, by dla rozkładu Gaussa uzyskać wartość 0. Wielkość kurtozy świadczy o szybkości spadku gęstości (histogramu). Duża kurtoza, to spadek jest dynamiczny większy od spadku w rozkładzie gaussowskim, mała, to gęstość jest płaska.

² Miara asymetrii, iloraz trzeciego momentu centralnego i trzeciej potęgi odchylenia standardowego. Histogram symetryczny charakteryzuje się podobieństwem obu części histogramu względem pewnej wartości. Jeśli histogram nie jest symetryczny, mówimy asymetryczny i podajemy miarę asymetrii, nazywaną skośnością. Skośność dodatnia oznacza rozciągnięcie histogramu w prawo (powodując asymetrię).

dlatego, mimo korzystnych wyników testowania, nie można było odwołać się do decyzji opartych na tych wynikach. W takich przypadkach zastosowana została metoda porównania częstości. Głównym narzędziem był tutaj test dwumianowy Bernoulliego. Przyjęto, że jeśli częstość zjawiska nie przekracza 5%, to uznajemy je za statystycznie niezauważalne (zaniedbywalne). W konsekwencji w każdej z tablic badano czy zjawisko jest statystycznie znamienne, czy też można je pominąć w sensie statystycznym. W tekście testowanie to występuje pod nazwą testu porównania przekroczeń pięcioprocentowych. W analizie tej podawano nazwę testu, wartość empiryczną (N), wartość krytyczną (N_{α}) i poziom istotności dla tej wartości krytycznej (p).

Jako graniczy poziom istotności przyjęto $p = 0,05$. W przypadku poziomu istotności mniejszego od 0,001 pisano zawsze $p < 0,001$. Jeśli poziom istotności był poniżej 0,05 to podejmowano decyzję o istotności różnicy lub częstości.

Obliczenia zostały wykonane z użyciem pakietu statystycznego Statistica 8.0 i środowiska obliczeń statystycznych R 2.6.1 [149-151].

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka grup badanych.

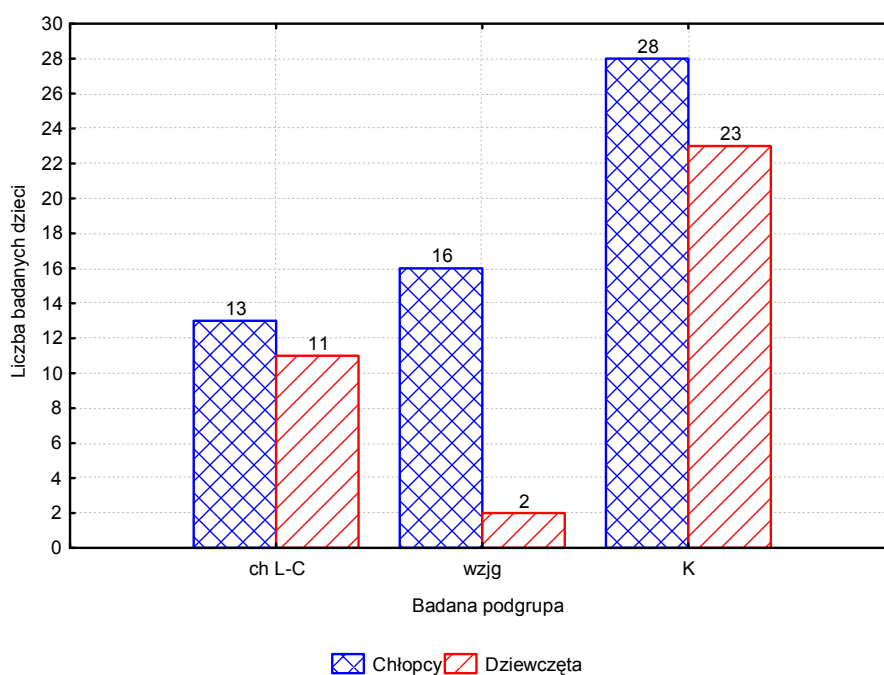
Ogółem w badaniu wzięło udział 93 dzieci, 57 chłopców (61,3%) i 36 (38,7%) dziewcząt. Badana populacja została podzielona na trzy grupy.

Grupę I i II stanowiło 42 dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit (NZJ): wrzodziejące zapalenie jelita grubego (wzjg; grupa I) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ch.L-C; grupa II).

Grupę III (K), kontrolną, stanowiło 51 dzieci zdrowych.

Spośród 42 chorych dzieci, w tym 13 dziewczynek (30,95%) i 29 chłopców (69,05%), u 18 rozpoznano wrzodziejące zapalenie jelita grubego (grupa I, wzjg; N=18), a u 24 chorobę Leśniowskiego-Crohna (grupa II, ch.L-C; N=24).

Ogólną charakterystykę badanych dzieci w poszczególnych grupach przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Udział chłopców i dziewczynek w poszczególnych grupach badanych dzieci

Stwierdzono statystycznie istotną zależność między płcią i rozpoznaniem. U dziewczynek częściej zdiagnozowano chorobę Leśniowskiego-Crohna (dokładny test Fishera; $p < 0,020$).

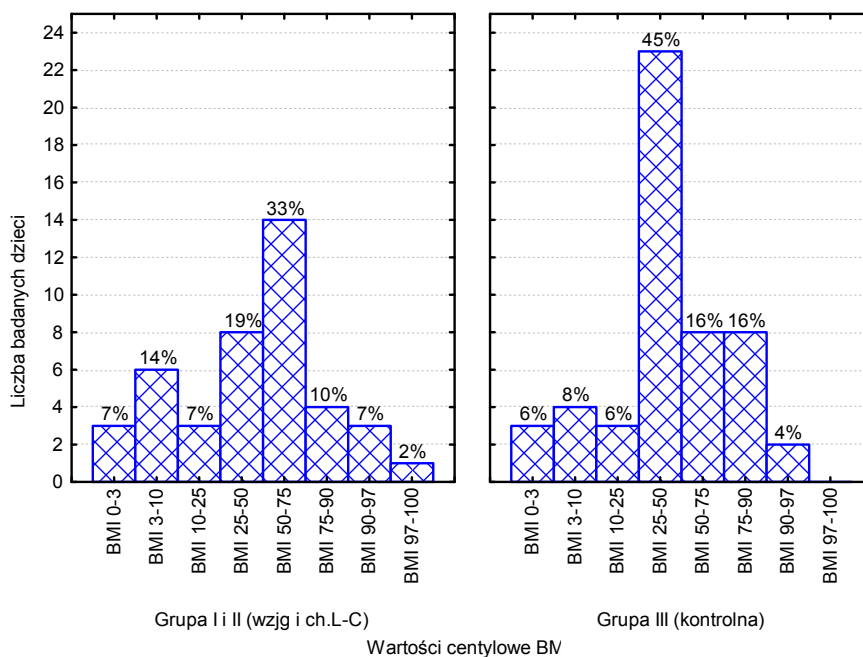
Wiek wszystkich badanych dzieci mieścił się w przedziale od 4 do 18 lat (średnia 13,7 lat; SD: 3,78, mediana 17,7 lat). Szczegółowe wyniki statystyk opisowych dla wieku w poszczególnych grupach znajdują się w tabeli 3.

Tab. 3. Wiek badanych dzieci

| Grupa badana | N | Średni wiek (lata) | SD | Min | Max | Mediana |
|-------------------|----|--------------------|------|------|------|---------|
| Grupa I (wzjg) | 18 | 14,8 | 3,87 | 4,07 | 17,6 | 17,0 |
| Grupa II (ch.L-C) | 24 | 14,6 | 3,26 | 5,0 | 18 | 16,0 |
| Grupa III (K) | 51 | 12,8 | 3,84 | 4,4 | 17,8 | 13,7 |
| Ogółem | 93 | 13,7 | 3,78 | 4,1 | 18 | 14,7 |

W badanych grupach dzieci stan odżywienia oceniono na podstawie współczynnika masy ciała (BMI-body mass index) i współczynnika Cole'a (CI – Cole's Index).

Wyliczone współczynniki masy ciała wyrażono jako wartości centylowe BMI. Wyniki rozkładu centylowego BMI zostały zaprezentowane na rycinie 2.



Ryc. 2. Stan odżywienia badanych dzieci (grupa I, II, III) wyrażony jako rozkład centylowy BMI

Zaobserwowano, że częstość niskich wartości centylowych BMI była większa u dzieci chorych (grupy I i II), co przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Porównanie częstości występowania niskich wartości centylowych BMI w grupie I i II- dzieci chorych (wzjg i ch. L-C) i grupie III - kontrolnej

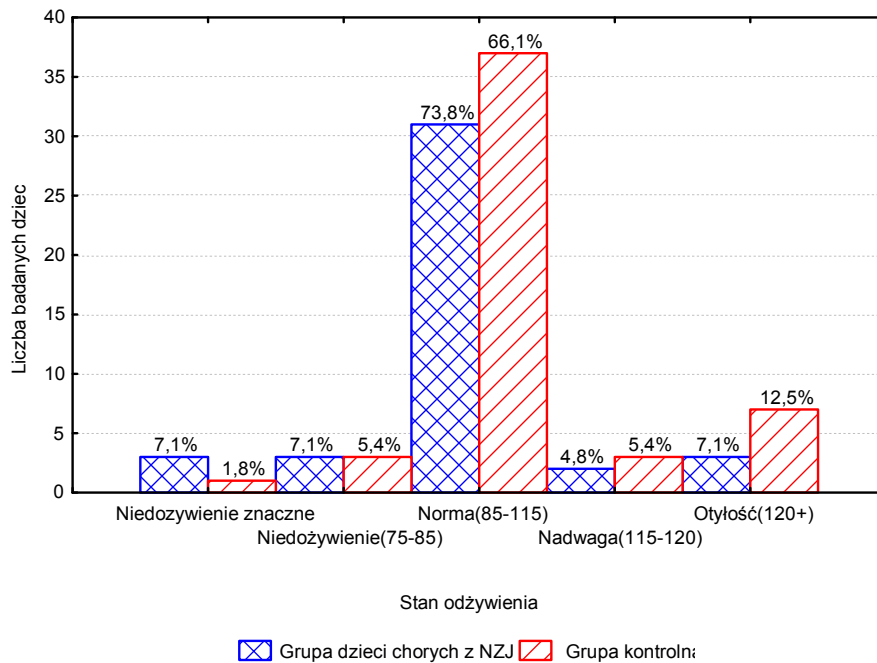
| | | | | | |
|--------------|----|-----|-----|----------|---------|
| Grupa I i II | N | Min | Max | Skośność | Kurtoza |
| centyl BMI | 42 | 1 | 8 | -0,191 | -0,432 |
| Grupa III | N | Min | Max | Skośność | Kurtoza |
| centyl BMI | 51 | 1 | 7 | -0,360 | 0,190 |

W całej badanej populacji wartości współczynnika Cole'a (CI) mieściły się w zakresie od 61,6% do 145,8%, średnia 102,7%; SD:15,7; mediana 101,75%. Rozkład wartości CI z podziałem na grupy zawarto w tabeli 5.

Tab. 5. Stan odżywienia dzieci chorych z grupy I (wzjg) i grupy II (ch. L-C) i zdrowych z grupy III (K) wyrażony współczynnikiem Cole'a

| Współczynnik Cole'a (%) | Grupa I | Grupa II | Grupa III | Liczba dzieci |
|------------------------------------|---------|----------|-----------|---------------|
| Niedożywienie znaczne (poniżej 75) | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Niedożywienie (75-85) | 1 | 2 | 3 | 6 |
| Norma (85-115) | 13 | 18 | 37 | 68 |
| Nadwaga (115-120) | 1 | 1 | 3 | 5 |
| Otyłość (powyżej 120) | 2 | 1 | 7 | 10 |
| Liczba dzieci | 18 | 24 | 51 | 93 |

W grupie I i II rozkład wartości współczynnika Cole'a stanowił odwzorowanie naturalnego rozkładu występującego w populacji. Przetawia to rycina 3.



Ryc. 3. Stan odżywienia dzieci w oparciu o współczynnik Cole' a

Niedożywienie ($CI < 85\%$) w grupie dzieci chorych w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej występowało w sposób statystycznie znamienne (test porównania przekroczeń 5, $p < 0,0411$). Ponadto znamienne częściej obserwowano niedożywienie w grupie dzieci z ch.L-C (grupie II) w porównaniu do dzieci z wżjg (grupa I) (test porównania przekroczeń, $p < 0,0109$).

4.2. Charakterystyka dzieci chorych z grupy I i II

4.2.1. Czas trwania choroby

Czas trwania choroby został ustalony w oparciu o badanie podmiotowe oraz dokumentację medyczną. Liczony od chwili ustalenia rozpoznania do czasu badania wynosił od 1 do 109 miesięcy (średnio 38,9 miesięcy; SD 26,22, mediana 40 miesięcy). Należy zaznaczyć, że u niektórych pacjentów objawy mogące sugerować NZJ występowały wcześniej, jednak nie ustalono wówczas rozpoznania choroby.

4.2.2. Badania laboratoryjne

Analizie poddano wskaźniki laboratoryjne stanu zapalnego oraz oceniono aktywność choroby na podstawie następujących parametrów: liczba krwinek białych (WBC), liczba krwinek płytkowych (PLT), szybkość opadania krwinek czerwonych (OB), stężenie białka reaktywnego-C (CRP), fibrynogenu oraz albuminy (alb), żelaza (Fe) i

wapnia (Ca) w surowicy krwi, a także obecności krwi utajonej w kale.

U 15 dzieci chorych na NZJ (35,7%) stężenie żelaza było poniżej wartości referencyjnej; 1 dziecko (2,38%) miało nieznacznie obniżone stężenie albuminy w surowicy. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono obniżonego stężenia wapnia ani fosforanów w surowicy krwi.

Analiza parametrów stanu zapalnego wykazała, że przyspieszone opadanie krwinek czerwonych występowało u 12 chorych (28,57%); u 10 (23,81%) podwyższone stężenie CRP, wyższa liczba białych krwinek u 13 (30,95%). Sześcioro dzieci (14,29%) miało podwyższoną liczbę krwinek płytkowych. W dniu badania 8 pacjentów (19,04%) miało zwiększone stężenie fibrynogenu a 23 (54,76%) dodatni wynik na obecność krwi utajonej w kale (tab. 6 i 7).

Tab. 6. Wyniki poszczególnych badanych parametrów biochemicznych u dzieci chorych z NZJ łącznie dla grupy I i II

| Parametr badany | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|------------------|----|---------|-------|--------|--------|---------|
| CRP [mg/l] | 42 | 7,62 | 16,29 | 0,30 | 80,30 | 0,95 |
| OB [mm/h] | 42 | 18,357 | 17,86 | 1,10 | 70,00 | 10,00 |
| Fibrynogen [g/l] | 42 | 3,80 | 2,82 | 1,86 | 20,00 | 2,99 |
| Albumina [g/l] | 42 | 43,45 | 4,34 | 30,00 | 50,00 | 44,30 |
| WBC [G/l] | 42 | 8,52 | 3,78 | 3,89 | 22,42 | 7,90 |
| PLT [k/Ul] | 42 | 331,48 | 94,10 | 157,00 | 592,00 | 315,00 |
| Żelazo [ug/dl] | 42 | 63,32 | 39,18 | 8,00 | 160,00 | 49,00 |
| Wapń [mg/dl] | 42 | 9,66 | 0,44 | 8,70 | 10,61 | 9,57 |

Tab. 7. Częstość dodatniego wyniku testu na obecność krwi utajonej w kale w grupie dzieci chorych z NZJ (łącznie grupa I i II)

| Krew utajona w kale | Liczba pacjentów | Procent (%) |
|---------------------|------------------|-------------|
| Nieobecna | 19 | 45,24 |
| Obecna | 23 | 54,76 |
| Liczba dzieci | 42 | 100 |

4.2.3. Aktywność choroby

Aktywność procesu chorobowego oceniano w oparciu o stosowane w Polsce skale: Pediatric Crohn Disease Activity Index (PCDAI) wg. *Hyamsa* dla choroby Leśniowskiego - Crohna i Truelove - Wittsa dla wrzodziejącego zapalenia jelit, obie w modyfikacji *Woynarowskiego i Ryzki*. Dla tych celów oceniano omówione powyżej parametry laboratoryjne (tab. 6 i 7) i ustalono aktywność choroby u każdego badanego dziecka z NZJ.

Wśród pacjentów z grupy I (wzjg) 12 chorych miało łagodną postać choroby, zaś 6 – umiarkowaną (tab.8).

U 12 dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna (grupa II) stwierdzono postać nieaktywną choroby, u 11 lekką i u 1 dziecka umiarkowaną (tab. 9). W celu uproszczenia dalszych analiz chłopiec, u którego rozpoznano umiarkowaną postać ch. L-C został włączony do grupy dzieci z postacią lekką choroby. W aspekcie aktywności choroby, w dalszych analizach, dzieci z grupy II podzielono na dwie podgrupy – z aktywną (12 osób, 50,0%) i nieaktywną postacią choroby.

Tab. 8. Liczba dzieci z grupy I (wzjg) a aktywność choroby

| Aktywność wzjg | Liczba pacjentów | Procent (%) |
|----------------|------------------|-------------|
| Łagodna | 12 | 66,67 |
| Umiarkowana | 6 | 33,33 |
| Liczba dzieci | 18 | 100 |

Tab. 9. Liczba dzieci z grupy II (ch.L-C) a aktywność choroby

| Aktywność ch.L-C | Liczba pacjentów | Procent (%) |
|------------------|------------------|-------------|
| Nie występuje | 12 | 50,00 |
| Lekka | 11 | 45,83 |
| Umiarkowana | 1 | 4,17 |
| Liczba dzieci | 24 | 100 |

4.2.4. Stosowane leczenie

W kolejnym etapie analizowano przebieg leczenia każdego z badanych pacjentów.

Pochodne kwasu 5 – aminosalicylowego (5-ASA).

Wszyscy pacjenci byli leczeni przeciwwzapalnie pochodnymi kwasu 5-aminosalicylowego (mesalazyna, sulfasalazyna). W chwili badania wszyscy otrzymywali powyższe preparaty. Całkowita kumulacyjna dawka 5-ASA wahała się od 36 g do 6649 gramów (średnia 1975,2 g SD: 1395,21, mediana 1678g) z czasem leczenia od 21 do 3324 dni (średnio 943,21dni; SD: 636, mediana 910 dni), a dawka dzienna wynosiła od 0,18g do 3,6 gramów (średnia 2,09 g; SD: 0,89 g; mediana 2,02 g).

Glukokortykosterydy (GKS)

Spośród 42 pacjentów z NZJ u 40 stosowano terapię glukokortykosterydami – w tym u 36 dzieci o działaniu ogólnoustrojowym. Siedmiu pacjentów w chwili badania było w trakcie sterydoterapii, u pozostałych czas, jaki upłynął od ostatniej podanej dawki preparatu sterydowego wynosił średnio 651 dni; SD 539,47 (od 45 do 1826 dni; mediana 580 dni).

Dawki GKS, z wyłączeniem budezonidu, przeliczono i wyrażono jako równoważne miligramom prednizolonu. Uwzględniono całkowitą dawkę i łączny czas otrzymywania leku przez każdego pacjenta, a także ilość kursów sterydoterapii. Dokonano podziału na grupę dzieci, które nigdy nie były leczone sterydami ogólnoustrojowymi – 6 osób (14%) i pozostałe – leczone sterydami.

Jedenastu pacjentów otrzymywało budezonid. Dawka sumacyjna tego leku, u poszczególnych pacjentów, wynosiła od 90 mg do 2440 mg (średnio 1097,9 mg; SD 916,84; mediana 810 mg), podawanych w ciągu od 21 do 265 dni (średnio 92,82 dni; SD 83,9; mediana 60 dni); dawka dzienna wynosiła od 3 mg do 9 mg budezonidu (tab. 10 - 12).

Tab. 10. Łączna dawka, liczba dni i średnia dzienna dawka glukokortykosterydów (GKS) stosowanych w terapii (równoważnych mg prednizolonu) w grupie dzieci chorych (I i II)

| | N | Średnio | SD | Min | Max | Mediana |
|--------------|----|---------|-------|-------|-------|---------|
| GKS [mg] | 36 | 6700,8 | 12675 | 400,0 | 77535 | 3439,0 |
| GKS [dni] | 36 | 193,9 | 183,5 | 4,0 | 898,0 | 144,5 |
| GKS [mg/dni] | 36 | 38,7 | 51,6 | 8,5 | 324 | 29,1 |

Tab. 11. Liczba kursów sterydoterapii u dzieci z grupy I i II (wzjg, ch.L-C)

| | Liczba dzieci (N) | Procent (%) |
|---------------|-------------------|-------------|
| Kursów 0 | 6 | 14 |
| Kursów 1 | 20 | 48 |
| Kursów 2 | 12 | 28 |
| Kursów 3 | 2 | 5 |
| Kursów 4 | 2 | 5 |
| Liczba dzieci | 42 | 100 |

Azatiopryna

U 26 pacjentów (61,9%) w terapii stosowana była azatiopryna, przez okres od 11 do 1720 dni (średnio 635,5 dni; SD: 527, mediana 661dni). Łączna dawka, u poszczególnych chorych, wahała się od 1100 mg do 209750 mg (średnio 52438 mg; SD: 52737, mediana 38112,5 mg).

Dane uwzględniające sumaryczne dawki analizowanych leków przedstawia tabela 12.

Tab. 12. Dawki leków (mg) zastosowanych w terapii dzieci chorych na NZJ

| Lek | Liczba dzieci [N] | Średnia dawka [mg] | SD | Min | Max | Mediana |
|-------------|-------------------|--------------------|-------|------|--------|---------|
| Budezonid | 11 | 1098 | 917 | 90 | 2440 | 810 |
| Azatiopryna | 26 | 52439 | 52738 | 1100 | 209750 | 38113 |
| 5ASA | 42 | 1975 | 1395 | 36 | 6649 | 1678 |

Cyklosporyna A

U 7 dzieci (9,7%) stosowano leczenie cyklosporyną A: 5 z grupy I (wzjg) i 2 z grupy II (ch.L-C). Terapia monitorowana była stężeniem leku we krwi i w zależności od niego modyfikowano dawki. W chwili badania żaden pacjent nie otrzymywał cyklosporyny A.

Leczenie biologiczne

Spośród wszystkich analizowanych pacjentów 8 otrzymywało leczenie biologiczne monoklonalnym przeciwciałem anty TNF- α (Infliximabem). Dwoje z nich (25%) chorowało na wzjg (grupa I), a sześcioro (75%) na ch L-C (grupa II). Zgodnie z protokołem leczniczym, dawka leku wynosiła 5mg/kg masy ciała [152]. Pacjenci otrzymali od 2 do 6 dawek. Czas, jaki upłynął od ostatniej dawki leku biologicznego do dnia badania, mieścił się w granicach od 1 do 297 dni.

Do dalszych analiz, po uwzględnieniu stosowanego leczenia biologicznego, przyjęto podział pacjentów na 2 grupy: leczonych (8 osób, 19,0%) i nieleczonych biologicznie.

Leczenie żywieniowe

Dziesięcioro dzieci chorych na NZJ (23,81%) było w przeszłości leczonych metodą kompletnego żywienia pozajelitowego, a 7 dzieci (16,67%) – dojelitowo, poprzez zgłębnik dożołądkowy.

4.3. Ocena gęstości mineralnej kości metodą densytometrii

Korzystając z metody absorpcjometrii podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego (DXA) oceniano gęstość mineralną kości (BMD) dla poszczególnych 4 kręgów odcinka lędźwiowego kręgosłupa (od L1 do L4). Uzyskane wyniki wyrażono jako wartość bezwzględną [g/cm^2], odsetek wartości prawidłowej (procent normy), a także jako ilość odchyłeń standardowych od średniej dla danego wieku i płci badanej populacji (Z-score). Wykorzystano do porównań istniejącą dla populacji dzieci polskich bazę danych referencyjnych opracowaną przez *Lorenca* [153]. Uzyskane wartości Z-score mieściły się w przedziale od $-5,1$ do $1,5$. Wyznaczono także średnią BMD dla wszystkich 4 ocenianych kręgów (Z-score L1-L4) i wyniosła ona $1,49\text{g}/\text{cm}^2$. Dane zebrano w tabeli 13.

Tab. 13. Gęstość mineralna kości dzieci z NZJ dla poszczególnych kręgów

łędźwiowych (L1-L4)

| BMD kręgu odcinka łędźwiowego | N | Średnia | SD | Min | Max | Mediana |
|---------------------------------------|----|---------|-------|-------|--------|---------|
| L1 [g/cm ²] | 42 | 0,87 | 0,22 | 0,41 | 1,26 | 0,87 |
| Z - score L1 | 42 | -1,41 | 1,26 | -4,60 | 1,00 | -1,20 |
| % normy | 42 | 86,07 | 12,35 | 60,00 | 113,70 | 85,00 |
| L2 [g/cm ²] | 42 | 0,97 | 0,25 | 0,46 | 1,59 | 0,97 |
| Z - score L2 | 42 | -1,59 | 1,29 | -5,10 | 1,30 | -1,55 |
| % normy | 42 | 85,23 | 12,05 | 59,00 | 111,00 | 84,00 |
| L3 [g/cm ²] | 42 | 1,00 | 0,26 | 0,52 | 1,66 | 0,97 |
| Z - score L3 | 42 | -1,28 | 1,38 | -4,60 | 2,40 | -1,20 |
| % normy | 42 | 88,00 | 12,20 | 63,00 | 119,00 | 86,00 |
| L4 [g/cm ²] | 42 | 0,93 | 0,23 | 0,50 | 1,34 | 0,93 |
| Z - score L4 | 42 | -1,80 | 1,35 | -5,00 | 1,00 | -1,80 |
| % normy | 42 | 83,37 | 12,27 | 58,00 | 109,00 | 81,00 |
| BMD Z-score L1-L4[g/cm ²] | 42 | 0,940 | 0,23 | 0,48 | 1,37 | 0,93 |
| Z - score średni | 42 | -1,49 | 1,29 | -4,80 | 1,50 | -1,40 |
| % normy | 42 | 85,76 | 11,91 | 60,00 | 112,00 | 84,00 |
| Max Z -score L1 do L4 | 42 | -1,47 | 1,27 | -4,60 | 1,00 | -1,30 |
| Min Z - score L1 do L4 | 42 | -1,47 | 1,69 | -5,10 | 2,40 | -1,70 |
| Min % normy L1 do L4 | 42 | 81,62 | 11,82 | 58,00 | 108,00 | 80,00 |
| Max % normy L1 do L4 | 42 | 88,97 | 12,11 | 63,00 | 119,00 | 88,00 |

Analizując średnie wartości Z-score dla poszczególnych kręgów, stwierdzono, że niższe wartości występowały u pacjentów z grupy II (ch.L-C) w porównaniu z grupą I (wzjg). Jednak nie były to różnice istotne statystycznie. Zaobserwowano, że najniższe wartości średnie Z-score były dla 4. kręgu łędźwiowego. Niemniej, zgodnie z zaleceniami ISCD [128], do dalszej analizy użyto wartości średnie dla wszystkich czterech kręgów łędźwiowych tzn. L1-L4.

U 12 dzieci, na podstawie przyjętych kryteriów, stwierdzono gęstość mineralną kości kręgów łędźwiowych poniżej wartości oczekiwanej dla wieku (tj. Z-score poniżej –

2,0). W tej grupie, 7 dzieci (58,33%) chorowało na ch.L-C, a 5 na wzjg (41,67%). Tym samym, 29,17% dzieci z grupy II (ch. L-C) i 27,78% pacjentów z grupy I (wzjg) miało obniżoną gęstość mineralną kości, wyrażoną jako Z-score poniżej -2,0.

W oparciu o tę wartość Z-score wyróżniono dwie grupy: z prawidłową (Z-score powyżej -2,0) i obniżoną (Z-score poniżej -2,0) gęstością mineralną kości (tab. 14).

Tab. 14. Częstość występowania BMD obniżonej i w granicach normy dla wieku

| BMD Z - socre | Liczba chorych | Procent (%) |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| Z-score L1-L4 poniżej - 2,0 | 12 | 28,57 |
| Z-score L1-L4 powyżej - 2,0 | 30 | 71,43 |

Następnie badano różnice w stopniu mineralizacji kości w zależności od płci u dzieci z grupy I i II (wzjg I ch.L-C).

Stwierdzono statystycznie istotną zależność między płcią i Z-score L1-L4. W badanej grupie dzieci chorych, dziewczynki miały częściej średni Z-score w granicach wartości oczekiwanych dla wieku niż chłopcy (test χ^2 ; $\chi^2[1] = 4,39$, $p < 0,036$).

Analizując stosowane leczenie nie stwierdzono związku między występowaniem wartości BMD Z-score L1-L4 poniżej oczekiwanej dla wieku (tj. poniżej -2,0) a: sterydoterapią ogólnoustrojową, leczeniem biologicznym, żywieniowym i azatiopryną. Natomiast pacjenci leczeni budezonidem mieli znamienne częściej wartość BMD Z-score L1-L4 w granicach normy oczekiwanej dla wieku niż dzieci, które nie były leczone budezonidem (test porównania przekroczeń 5%; $N = 2$, $N_\alpha = 3$, $p < 0,006$; $N = 10$, $N_\alpha = 4$, $p < 0,049$) (tab.15).

Tab. 15. Gęstość mineralna kości (BMD Z-score L1-L4) a leczenie budezonidem

| Leczenie budezonidem | Z-score L1-L4 poniżej - 2,0 | Z-score L1-L4 powyżej - 2,0 | Liczba dzieci |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Nie stosowano (%) | 10 (32,25%) | 21 (67,75%) | 31(100%) |
| Stosowano (%) | 2 (18,18%) | 9 (81,82%) | 11 (100%) |
| Liczba dzieci | 12 | 30 | 42 |

4.4 Stężenie osteoprotegeryny (OPG)

4.4.1 Stężenie OPG w grupie dzieci chorych (I, II) i w grupie kontrolnej (III)

Oznaczone stężenia osteoprotegeryny w całej badanej populacji mieściły się w

granicach od 0,03 do 10,2 pmol/l (średnia 3,99 pmol/l; SD: 1,56; mediana 3,95 pmol/l). Mediana stężenia OPG w grupie dzieci zdrowych (III) wyniosła 3,61 pmol/l. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 15-16.

Tab. 15. Średnie stężenie osteoprotegeryny (OPG [pmol/l]) w poszczególnych grupach

| Grupa dzieci | N | Średnie stężenie OPG [pmol/l] | SD | Min | Max | Mediana |
|-----------------|----|-------------------------------|------|------|------|---------|
| Dzieci chore | 42 | 4,09 | 1,35 | 0,20 | 7,3 | 4,10 |
| Grupa kontrolna | 51 | 3,91 | 1,72 | 0,03 | 10,2 | 3,61 |
| Ogółem | 93 | 3,99 | 1,56 | 0,03 | 10,2 | 3,95 |

Tab. 16. Częstość występowania wartości stężenia osteoprotegeryny poniżej i powyżej mediany dla grupy kontrolnej (tj. 3,61 pmol/l) w badanej populacji (grupa I, II i III)

| Grupa badana | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci (100%) |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Grupa I, II (wzjg, ch.L-C) (%) | 13 (30,95%) | 29 (69,05%) | 42 (100%) |
| Grupa III (K) (%) | 25 (49,02%) | 26 (50,98%) | 51(100%) |
| Liczba dzieci | 38 | 55 | 93 |

Wartość średnia oraz mediana stężenia OPG były wyższe w grupie dzieci chorych (I i II), jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej. Dla całej badanej populacji nie stwierdzono również istotnej statystycznie różnicy stężeń w zależności od płci badanych (tab. 17).

Tab. 17. Stężenie osteoprotegeryny (OPG [pmol/l]) a płeć badanych dzieci

| Płeć | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|------------|----|---------|------|------|-------|---------|
| Chłopcy | 57 | 4,07 | 1,35 | 0,20 | 7,60 | 4,12 |
| Dziewczęta | 36 | 3,86 | 1,86 | 0,03 | 10,20 | 3,45 |
| Ogółem | 93 | 3,99 | 1,56 | 0,03 | 10,20 | 3,95 |

Wykazano jednak, że u chłopców z grupy III (K) wartości stężenia OPG powyżej mediany występowały statystycznie częściej niż u zdrowych dziewczynek (test chi kwadrat, $p=0,036$). Szczegółowa analiza wykazała, że u chorych chłopców częstość przekroczenia 25. kwartyła wartości stężenia OPG (Q25% dla grupy kontrolnej) występowała w sposób statystycznie znamienne, czego nie stwierdzono u chorych dziewcząt (test porównania przekroczeń 5%; $N = 5, N_{\alpha} = 5, p < 0,014; N = 1, N_{\alpha} = 3, p < 0,024$). Wynik ten koresponduje ze zjawiskiem występowania niższego stężenia OPG u płci żeńskiej w grupie kontrolnej. W grupie dzieci chorych podobnej zależności nie obserwowano (tab. 18).

Tab. 18. Stężenie osteoprotegeryny poniżej mediany i powyżej mediany grupy III (3,61 pmol/l) z uwzględnieniem płci

| Badana grupa | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Grupa I i II (wzjg i ch.L-C) | 13 (30,95%) | 29 (69,05%) | 42 (100%) |
| Chłopcy (%) | 8 (27,59%) | 21 (72,41%) | 29 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 5 (38,46%) | 8 (61,54%) | 13 (100%) |
| Grupa III (K) | 25 (49,02%) | 26 (50,98%) | 51 (100%) |
| Chłopcy (%) | 10 (35,71%) | 18 (64,29%) | 28 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 15 (65,22%) | 8 (34,78%) | 23 (100%) |

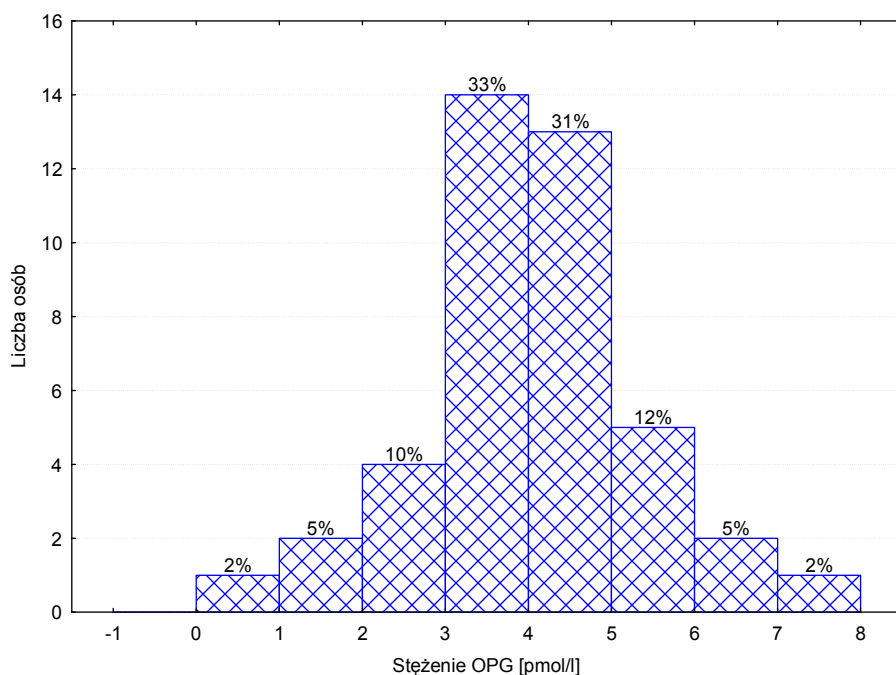
4.4.2. Wyznaczenie wartości referencyjnych stężenia osteoprotegeryny

Jako wartość referencyjną przyjęto stężenie osteoprotegeryny równe 3,61 pmol/l, które odpowiadało medianie wartości uzyskanych u dzieci w grupie kontrolnej (OPG=Q50).

4.4.3. Stężenie OPG w grupie dzieci chorych (I i II)

W grupie dzieci chorych stężenie OPG mieściło się w granicach od 0,2 pmol/l do 7,29 pmol/l, średnio 4,09 pmol/l; SD: 1,35; mediana 4,10 pmol/l.

Rozkład wartości stężenia OPG w grupie dzieci chorych stanowił odwzorowanie rozkładu normalnego(ryc.4).



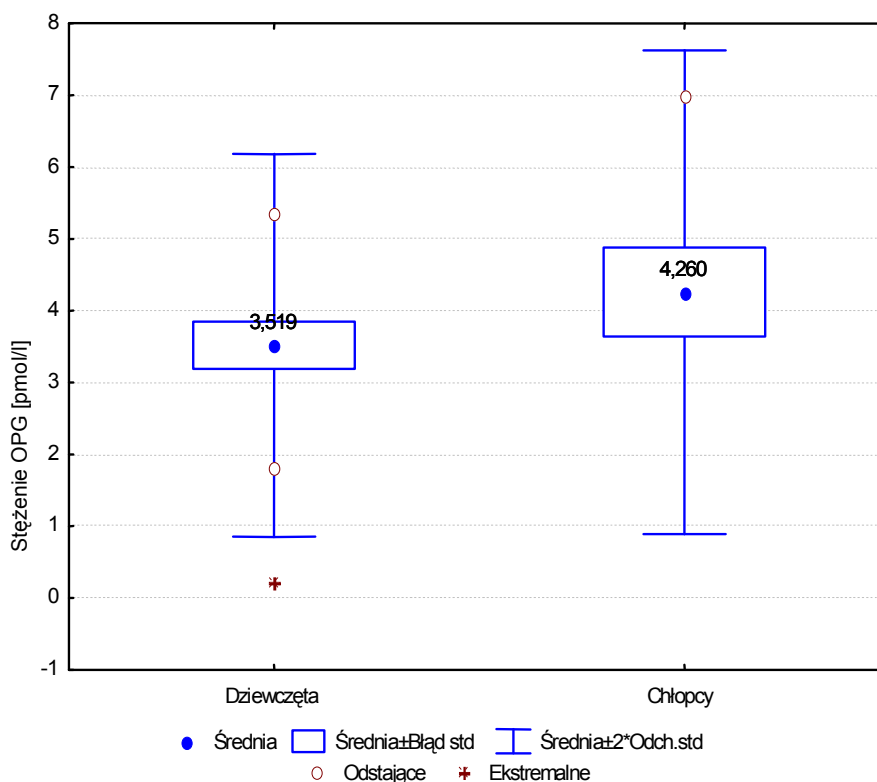
Ryc. 4. Stężenie osteoprotegeryny [pmol/l] u dzieci chorych na NZJ

Średnie stężenie OPG było wyższe u dzieci z grupy II (ch.L-C) niż u dzieci z grupy I (wzjg). Analiza wartości, po uwzględnieniu płci, wykazała, że średnie stężenie OPG było wyższe w grupie I u chłopców w porównaniu do dziewcząt, a w grupie II - przeciwnie - wyższe u dziewczynek, jednak nie była to różnica istotna statystycznie (tab. 19, ryc.5). Nie stwierdzono różnicy w średnich stężeniach OPG między chłopcami z grupy I (wzjg) a z grupy II (ch.L-C).

Tab. 19. Stężenie osteoprotegeryny [pmol/l] w grupie I i II (dzieci z NZJ) z uwzględnieniem płci badanych

| Dzieci | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|------------|----|---------|-------|-------|-------|---------|
| Grupa I | 18 | 3,789 | 1,399 | 0,200 | 7,290 | 3,830 |
| Chłopcy | 16 | 3,843 | 1,479 | 0,200 | 7,290 | 3,945 |
| Dziewczęta | 2 | 3,360 | 0,212 | 3,210 | 3,510 | 3,360 |

| | | | | | | |
|------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| Grupa II | 24 | 4,313 | 1,304 | 1,800 | 7,000 | 4,290 |
| Chłopcy | 13 | 4,145 | 1,084 | 1,800 | 5,620 | 4,200 |
| Dziewczęta | 11 | 4,511 | 1,556 | 1,800 | 7,000 | 4,400 |
| Ogółem | 42 | 4,088 | 1,355 | 0,200 | 7,290 | 4,100 |



Ryc.5. Stężenie OPG [pmol/l] a płeć w grupie dzieci chorych (I i II)

Następnie badano występowanie zależności między stężeniem osteoprotegeryny a stanem odżywienia oraz wynikami badań laboratoryjnych w grupie dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit (grupa I i II).

4.4.3.1 Stężenie OPG a stan odżywienia

Nie stwierdzono zależności między stężeniem OPG a stanem odżywienia dzieci chorych.

Wartości stężeń osteoprotegeryny w zestawieniu z wartościami centylowymi BMI

przedstawia tabela 20.

Tab. 20. Średnie stężenie osteoprotegeryny w grupie I i II, dzieci chorych (wzjg i ch.L-C) a stan odżywienia w oparciu o wartości centylowe BMI

| BMI (centyle) | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|---------------|----|---------|------|------|-----|---------|
| Grupa I i II | 42 | 4,09 | 1,35 | 0,20 | 7,3 | 4,10 |
| BMI 0-3 | 3 | 3,50 | 0,95 | 2,50 | 4,4 | 3,60 |
| BMI 3-10 | 6 | 4,13 | 0,81 | 3,50 | 5,6 | 3,92 |
| BMI 10-25 | 3 | 4,44 | 0,58 | 3,94 | 5,1 | 4,30 |
| BMI 25-50 | 8 | 3,95 | 1,42 | 1,80 | 5,6 | 4,14 |
| BMI 50-75 | 14 | 4,11 | 1,99 | 0,20 | 7,3 | 3,84 |
| BMI 75-90 | 4 | 4,20 | 0,73 | 3,28 | 4,8 | 4,37 |
| BMI 90-97 | 3 | 4,29 | 0,33 | 4,00 | 4,7 | 4,21 |
| BMI 97-100 | 1 | 4,30 | 0,00 | 4,30 | 4,3 | 4,30 |

Tab. 21. Średnie stężenie osteoprotegeryny OPG [pmol/l] a stan odżywienia, w oparciu o współczynnik Cole'a u dzieci z wzjg (grupa I) i ch.L-C(grupa II)

| | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|-----------------------|----|---------|-------|-------|-------|---------|
| Grupa I (wzjg) | 18 | 3,789 | 1,399 | 0,200 | 7,290 | 3,830 |
| Niedożywienie znaczne | 1 | 2,500 | 0,000 | 2,500 | 2,500 | 2,500 |
| Niedożywienie (75-85) | 1 | 3,500 | 0,000 | 3,500 | 3,500 | 3,500 |

| | | | | | | |
|-----------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| Norma (85-115) | 13 | 3,826 | 1,609 | 0,200 | 7,290 | 3,720 |
| Nadwaga (115-120) | 1 | 4,210 | 0,000 | 4,210 | 4,210 | 4,210 |
| Otyłość (120+) | 2 | 4,125 | 0,247 | 3,950 | 4,300 | 4,125 |
| Grupa II (ch.L-C) | 24 | 4,313 | 1,304 | 1,800 | 7,000 | 4,290 |
| Niedożywienie znaczne | 2 | 4,000 | 0,566 | 3,600 | 4,400 | 4,000 |
| Niedożywienie (75-85) | 2 | 3,915 | 0,403 | 3,630 | 4,200 | 3,915 |
| Norma (85-115) | 18 | 4,390 | 1,491 | 1,800 | 7,000 | 4,430 |
| Nadwaga (115-120) | 1 | 4,000 | 0,000 | 4,000 | 4,000 | 4,000 |
| Otyłość (120+) | 1 | 4,650 | 0,000 | 4,650 | 4,650 | 4,650 |
| Ogółem | 42 | 4,088 | 1,355 | 0,200 | 7,290 | 4,100 |

4.4.3.2. Stężenie OPG a badania laboratoryjne

U dzieci chorych z prawidłową szybkością opadania krwinek czerwonych (OB) stężenie OPG było częściej wyższe od wartości mediany dla grupy III, kontrolnej (3,61 pmol/l), niż w grupie dzieci chorych z podwyższonym OB (test jednostronny χ^2 ; $\chi^2[1] = 2,62$, $p < 0,053$).

Statystycznie niższe wartości OPG występowały u dzieci z prawidłowym stężeniem CRP (test porównania przekroczeń 5%; $N = 11$, $N_\alpha = 5$, $p < 0,0204$; $N = 2$, $N_\alpha = 3$, $p < 0,0115$) (tab. 22).

Tab. 22. Częstość występowania wartości OPG powyżej i poniżej mediany w zależności od stężenia CRP

| Stężenie CRP [mg/l] | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------|
| Prawidłowe | 11 (34,38%) | 21 (65,63%) | 32 |
| Podwyższone | 2 (20,00%) | 8 (80,00%) | 10 |
| Liczba dzieci | 13 | 29 | 42 |

Nie stwierdzono związku między wartością stężenia fibrynogenu, a częstością występowania stężenia OPG powyżej i poniżej wartości mediany dla grupy kontrolnej (3,61pmol/l; $p=0,61$).

U dzieci chorych nie stwierdzono także różnic w częstości występowania stężenia OPG powyżej i poniżej 3,61pmol/l w grupach ze zwiększoną liczbą krwinek płytkowych, obniżonym stężeniem żelaza, albuminy czy też obecnością krwi utajonej w kale.

Stwierdzono natomiast, że średnia wartość stężenia OPG w grupie I (wzjg) była wyższa u dzieci z obecną krwią utajoną w kale i u dzieci z podwyższoną liczbą krwinek białych. W grupie II (ch.L-C), przeciwnie, średnia wartość stężenia OPG była niższa u dzieci z dodatnim badaniem kału na obecność krwi i u pacjentów z leukocytozą. Nie były to jednak różnice znamienne.

4.4.3.3. Stężenie OPG a aktywność choroby NZJ

Zgodnie z przyjętą kategoryzacją pacjentów, w oparciu o właściwe skale punktowe, analizowano stężenie osteoprotegeryny u dzieci z różną aktywnością danej jednostki chorobowej (tab.23-24).

Tab. 23. Średnie stężenie osteoprotegeryny [pmol/l] w zależności od aktywności klinicznej choroby dzieci grupy I (wzjg)

| Aktywność wzjg | N | Średnie | SD | Min | Max | Mediana |
|----------------|----|---------|------|------|------|---------|
| Łagodna | 12 | 4,31 | 1,09 | 3,21 | 7,29 | 4,08 |
| Umiarkowana | 6 | 2,75 | 1,46 | 0,20 | 4,33 | 3,00 |
| Ogółem. | 18 | 3,79 | 1,40 | 0,20 | 7,29 | 3,83 |

Tab. 24. Średnie stężenie osteoprotegeryny [pmol/l], a aktywność kliniczna choroby dzieci z grupy II (ch.L-C)

| Aktywność ch.L-C | N | Średnie | SD. | Min | Max | Mediana |
|-------------------|----|---------|------|------|------|---------|
| Postać nieaktywna | 12 | 4,10 | 1,22 | 1,80 | 5,62 | 4,25 |
| Postać aktywna | 12 | 4,52 | 1,41 | 2,70 | 7,00 | 4,42 |
| Ogółem | 24 | 4,31 | 1,30 | 1,80 | 7,00 | 4,29 |

W grupie I (wzjg) u dzieci z umiarkowaną postacią choroby stężenie OPG < 3,61 pmol/l (mediana dla grupy kontrolnej) występowało częściej niż u dzieci z łagodną postacią choroby (test jednostronny χ^2 ; $\chi^2[1] = 2,92$, $p < 0,043$). Znacząco wyższe stężenie OPG stwierdzono u dzieci z łagodną postacią wzjg ($p < 0,039$) (tab.25).

U dzieci z grupy II (ch.L-C) - wartości stężenia OPG niższe niż mediana grupy III (3,61pmol/l) występowały w sposób statystycznie znamienne u chorych z postacią aktywną (test porównania przekroczeń 5%; $N = 4$, $N_\alpha = 3$, $p < 0,0196$; $N = 2$, $N_\alpha = 3$, $p < 0,0115$) (tab. 26).

Tab. 25. Częstość występowania wartości stężenia OPG powyżej i poniżej mediany (3,61pmol/l) dla grupy kontrolnej (III) u dzieci z grupy I (wzjg) w zależności od aktywności choroby

| Postać wzjg | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Łagodna (%) | 3 (25,00%) | 9 (75,00%) | 12 (100%) |
| Umiarkowana (%) | 4 (66,67%) | 2 (33,33%) | 6 (100%) |
| Liczba dzieci | 7 (38,89%) | 11 (61,11%) | 18 (100%) |

Tab. 26 Częstość występowania wartości stężenia OPG powyżej i poniżej mediany dla grupy III (3,61 pmol) u dzieci z grupy II (ch.L-C) w zależności od aktywności choroby

| Postać choroby L-C | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Nieaktywna (%) | 2 (16,67%) | 10 (83,33%) | 12 (100%) |
| Aktywna (%) | 4 (33,33%) | 8 (66,67%) | 12 (100%) |
| Liczba dzieci | 6 (25%) | 18 (75%) | 24 (100%) |

4.4.3.4. Stężenie OPG a stosowana terapia

Ocenie poddano statystyczne zależności między stosowaną terapią, a stężeniem OPG w surowicy badanych chorych.

Glukokortykosterydy (GKS)

Na podstawie wykonanych analiz, nie stwierdzono związku między stężeniem OPG, a zastosowaniem GKS: czasem trwania i liczbą kursów sterydoterapii, sumaryczną oraz dzienną dawką GKS równoważną miligramom prednizolonu.

Budezonid

Nie stwierdzono związku między leczeniem budezonidem a stężeniem OPG w surowicy.

Azatiopryna

Nie wykazano zależności między terapią azatiopryną a stężeniem OPG w surowicy.

Pochodne kwasu 5-amino-salicylowego (5-ASA)

Nie stwierdzono związku między leczeniem 5-ASA a stężeniem OPG w surowicy.

Podsumowanie analiz dotyczących związku między stosowanym leczeniem a

stężeniem OPG powyżej i poniżej mediany grupy kontrolnej (3,61 pmol/l) zamieszczono w tabeli 27.

Tab. 27. Częstość występowania wartości stężenia OPG wyższych i niższych niż mediana dla grupy kontrolnej (3,61 pmol/l) w zależności od leczenia

| Terapia | Stężenie OPG poniżej 3,61pmol/l | Stężenie OPG powyżej 3,61pmol/l | Liczba dzieci |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Budezonid (%) | 4 (36,36%) | 7 (63,64%) | 11 (100%) |
| Azatiopryną (%) | 8 (30,77%) | 18 (69,23%) | 26 (100%) |
| 5-ASA (%) | 13 (30,96%) | 29 (69,04%) | 42 (100%) |

Cyklosporyna A

Spośród 7 dzieci leczonych cyklosporyną A (CSA), u pięciorga stężenie OPG było wyższe od 3,61 pmol/l. Nie stwierdzono jednak statystycznej istotności w częstości występowania wyższego stężenia OPG między grupą leczoną a nieleczoną cyklosporyną A.

Infliximab

Ośmioro pacjentów było leczonych biologicznie monoklonalnym przeciwciałem anty-TNF α (Infliximab). Chociaż średnie stężenie OPG było niższe u dzieci leczonych, to różnica nie osiągnęła statystycznej istotności.

Leczenie żywieniowe

Nie stwierdzono także, aby leczenie żywieniowe miało związek ze stężeniem OPG. Zauważono jednak, tendencję do niższych średnich wartości stężeń OPG u dzieci z ch. L-C żywionych dojelitowo przez zgłębnik dożołądkowy w wywiadzie, bez istotności statystycznej ($p=0,45$).

4.4.3.5. Stężenie OPG a gęstość mineralna kości

Następnie oceniano, czy zachodzi związek między stężeniem osteoprotegeryny a gęstością mineralną kości wyrażoną jako Z-score BMD dla czterech kręgów lędźwiowych (L1 do L4) u dzieci chorych z NZJ (wzjg i ch.L-C).

Nie stwierdzono różnicy w częstości występowania stężeń OPG wyższych i niższych od 3,61pmol/l (mediany grupy III) u dzieci chorych z prawidłową i obniżoną gęstością mineralną kości (tab.28).

Tab. 28. Częstość występowania wartości stężenia OPG powyżej i poniżej mediany w grupie kontrolnej (3,61 pmol/l) u dzieci chorych (grupa I i II), z prawidłową i niższą wartością Z-scoreL1-L4 niż oczekiwana dla wieku

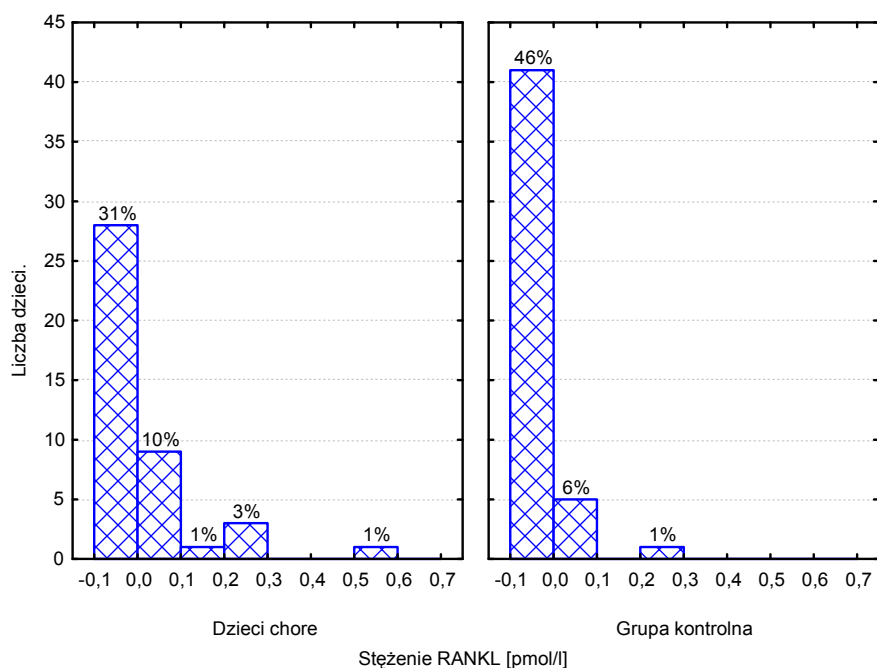
| | Z-score L1-L4 poniżej - 2,0 | Z-score L1-L4 powyżej - 2,0 | Ogółem (%) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Stężenie OPG poniżej 3,61 pmol/l (%) | 4 (31,77%) | 9 (69,23%) | 13 (100%) |
| Stężenie OPG powyżej 3,61 pmol/l (%) | 8 (27,59%) | 21 (72,41%) | 29 (100%) |
| Liczba dzieci | 12 (28,57%) | 30 (71,43%) | 42 (100%) |

4.5.1 Stężenie sRANKL w badanej populacji

Wartości stężenia sRANKL w całej badanej populacji (grupy I, II, III) wahały się w granicach 0,00 - 0,56 pmol/l (średnio 0,048 pmol/l; SD 0,083). Stwierdzono, że w grupie chorych dzieci średnie stężenie sRANKL [pmol/l] było wyższe niż w grupie kontrolnej ($p=0,001$). Wartości z podziałem na grupy przedstawia rycina 6 i tabela 29.

Tab. 29. Stężenie sRANKL [pmol/l] w grupie dzieci chorych (I i II) oraz grupie kontrolnej (III)

| Grupa pacjentów | N | Średnie | SD | Min | Max |
|-----------------|----|---------|------|-----|------|
| Dzieci chore | 42 | 0,05 | 0,11 | 0 | 0,56 |
| Grupa kontrolna | 51 | 0,01 | 0,05 | 0 | 0,30 |
| Ogółem | 93 | 0,03 | 0,08 | 0 | 0,56 |



Ryc. 6. Stężenie sRANKL [pmol/l] w grupie dzieci chorych (I i II) oraz grupie kontrolnej (III)

Wartości stężeń sRANKL charakteryzowały się specyficzną strukturą statystyczną. Przede wszystkim w grupie kontrolnej (III) były one bliskie zeru i często poniżej wartości czułości testu wyznaczonej przez producenta zestawu tj. 0,08 pmol/l. Niemniej jednak w wielu przypadkach udało się oznaczyć stężenie sRANKL w przedziale wartości między 0,00 pmol/l a 0,08pmol/l. Takie pomiary, ze względu metodologicznych, nie mogą być analizowane statystycznie w oparciu o średnie, mediany lub kwartyle. Wyniki otrzymane na podstawie tego typu procedur mogą być poważnie zafałszowane. Z tego względu dokonano analizy częstości występowania dodatniej wartości sRANKL. Przyjęto, zatem, że jakakolwiek dodatnia wartość świadczy o zauważalnych symptomach występowania sRANKL.

Postępowanie takie jest standardową techniką statystyczną w przypadkach, w których zachodzą trudności z oznaczeniem niewielkich wartości badawczych. Najpierw rozpatruje się częstość występowania wartości zerowych, a następnie analizuje średnią dla pomiarów dodatnich. W omawianym badaniu, z powodu zbyt małej liczby dodatnich pomiarów stężenia sRANKL, nie można było analizować średniej wartości dodatnich i zdecydowano o podjęciu procedury analizy częstościowej.

Podsumowanie częstości występowania dodatniej wartości sRANKL znajduje się w

tabeli 30. Przyjmując wartość progową czułości testu tj. stężenie sRANKL równe 0,08 pmol/l, jako diagnostyczną i uznając tę wartość jako podstawę podziału populacji, otrzymane częstości występowania wartości sRANKL w postaci oznaczonej diagnostycznie przedstawiono w tabeli 31.

Tab. 30. Częstość występowania nieoznaczalnych i oznaczalnych wartości stężenia sRANKL w poszczególnych grupach dzieci

| Grupa badana | sRANKL=0 pmol/l | sRANKL>0 pmol/l | Ogółem |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| Dzieci chore (%) | 28 (67%) | 14 (33%) | 42 (100%) |
| Grupa kontrolna (%) | 45 (88%) | 6 (12%) | 51 (100%) |
| Ogółem. | 73 (79%) | 20 (21%) | 93 (100%) |

Tab. 31. Częstość występowania diagnostycznych (>0,08 pmol/l) wartości stężenia sRANKL w poszczególnych grupach dzieci

| Grupa dzieci | sRANKL≤0,08 pmol/l | sRANKL>0,08 pmol/l | Ogółem |
|---------------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Dzieci chore (%) | 34 (81%) | 8 (19%) | 42 (100%) |
| Grupa kontrolna (%) | 49 (96%) | 2 (4%) | 51 (100%) |
| Ogółem (%) | 83 (89%) | 10 (11%) | 93 (100%) |

Jak wykazano, wartość dodatnia sRANKL [pmol/l] częściej występowała w grupie dzieci chorych z NZJ. Ponadto, częstość występowania diagnostycznie oznaczonej wartości sRANKL tj. >0,08 pmol/l była większa także u dzieci z tej grupy (jednostronny test dokładny Fishera $p < 0,020$). Stwierdzono, że u chorych chłopców (z grupy I i II) stężenie sRANKL>0,08 pmol/l występowało znamienne częściej niż u chorych dziewcząt (test porównania przekroczeń 5%; $N = 6$, $N_{\alpha} = 5$, $p < 0,014$; $N = 2$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,024$) (tab. 32). W grupie kontrolnej nie obserwowano podobnej zależności.

Tab. 32. Wartość stężenia sRANKL poniżej i powyżej wartości diagnostycznych,

tj. 0,08 pmol/l, u chłopców i dziewcząt w badanej populacji (grupa I, II, III)

| | sRANKL \leq 0,08pmol/l | sRANKL $>$ 0,08pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| Grupa I i II | 34 (80,95%) | 8 (19,05%) | 42 (100%) |
| Chłopcy (%) | 23 (79,31%) | 6 (20,69%) | 29 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 11 (84,62%) | 2 (15,38%) | 13 (100%) |
| Grupa III | 49 (96,08%) | 2 (4,92%) | 51 (100%) |
| Chłopcy (%) | 27 (96,42%) | 1 (3,58%) | 28 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 22 (95,65%) | 1 (4,35%) | 23 (100%) |

Uwzględniając płeć badanych dzieci, stwierdzono, że u zdrowych chłopców częstość dodatniej wartości sRANKL występowała w sposób statystycznie znaczący, a u dziewczynek częstość dodatnich wartości sRANKL nie występowała w sposób statystycznie znamienne (test porównania przekroczeń 5%; $N = 6$, $N_{\alpha} = 5$, $p < 0,014$; $N = 2$, $N_{\alpha} = 4$, $p < 0,026$) (tab. 33).

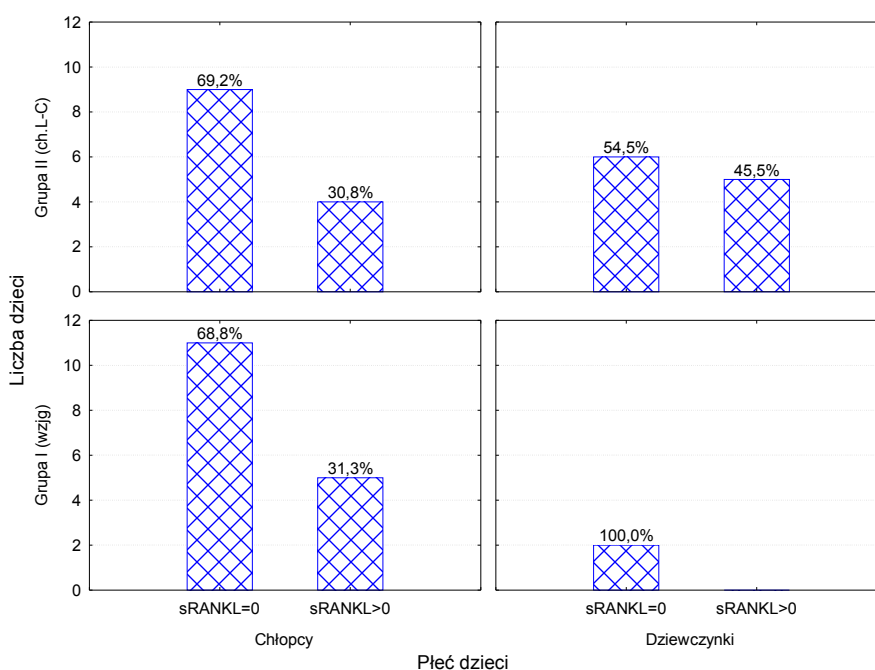
Tab. 33. Oznaczalne i nieoznaczalne wartości stężenia sRANKL w badanej grupie dzieci chorych (wzjg i ch.L-C) i zdrowych a płeć

| Grupa badana | sRANKL=0 pmol/l | sRANKL $>$ 0 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| Grupa I i II | 28 (67%) | 14 (33%) | 42 (100%) |
| Chłopcy (%) | 20(69%) | 9 (31%) | 29 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 8 (62%) | 5 (38%) | 13 (100%) |
| Grupa III | 43 (84%) | 8 (16%) | 51 (100%) |
| Chłopcy (%) | 22 (79%) | 6 (21%) | 28 (100%) |
| Dziewczęta (%) | 21 (91%) | 2 (9%) | 23 (100%) |

Ze względu na wspomnianą wcześniej specyficzną strukturę statystyczną wartości rozpuszczalnej formy liganda – RANK (nieliczne przypadki wartości dodatnich), ustalenie wartości referencyjnych stężenia sRANKL nie było możliwe. Do dalszych rozważań przyjęto analizę częstościową występowania stężeń powyżej wartości czułości testu (tj. 0,08 pmol/l), ale także analizę częstościową występowania wartości oznaczalnych i niemierzalnych sRANKL, odpowiednio: sRANKL $>$ 0 pmol/l i sRANKL=0 pmol/l.

4.5.2. Stężenie sRANKL w grupie dzieci z NZJ (wzjg, ch.L-C)

W grupie dzieci chorych (I i II) stężenia sRANKL mieściły się w granicach 0,0 pmol/l - 0,56 pmol/l, średnia 0,047 pmol/l; SD 0,11; mediana 0,0 pmol/l. U 14 dzieci (33,3%) wartości te były oznaczalne, to znaczy przyjmowały wartości wyższe niż zero. Nie stwierdzono różnic w stężeniu sRANKL między pacjentami z grupy I (wzjg) i z grupy II (ch.L-C) ($p=0,5$) (ryc.7).



Ryc. 7. Częstość występowania dodatnich wartości stężenia sRANKL [pmol/l] u dziewcząt i chłopców w grupie I (wzjg) i II (ch. L-C)

4.5.2.1. Stężenie sRANKL a stężenie OPG

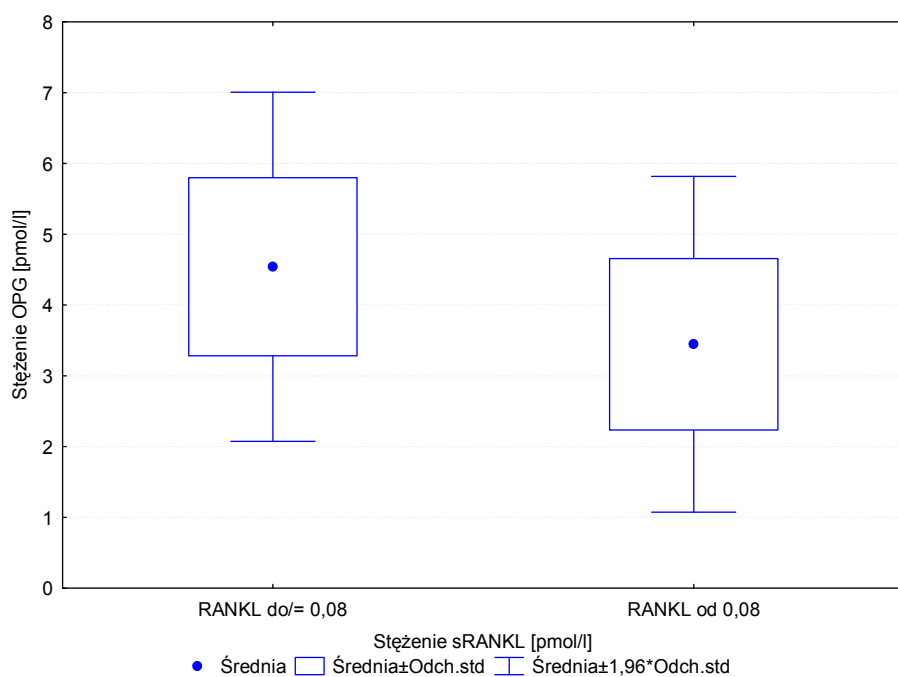
W grupie dzieci chorych (grupa I i II) wyższe średnie stężenie OPG obserwowano u tych pacjentów, u których stężenie sRANKL było niższe (wartości poniżej 0,08 pmol/l lub niewykrywalne). Różnice te nie były jednak statystycznie znamienne (tab. 34).

Stwierdzono, że w grupie II (ch. L-C), średnie stężenie osteoprotegeryny [pmol/l] było znacznie niższe u pacjentów, u których stężenie sRANKL było wyższe od 0,08 pmol/l (jednostronny test t-Studenta; $t [22]=1,7$; $p<0,048$) (ryc. 8).

Tab. 34. Średnie stężenie osteoprotegeryny (OPG [pmol/l]) w grupie I, II i III (wzjg,

ch.L-C i K) a stężenie sRANKL powyżej i poniżej 0,08pmol/l

| Grupa badana | N | Średnie | SD. | Min | Max | Mediana |
|----------------------|----|---------|-------|-------|-------|---------|
| Grupa I (wzjg) | 18 | 3,789 | 1,399 | 0,200 | 7,290 | 3,830 |
| sRANKL ≤ 0,08 pmol/l | 15 | 3,860 | 1,493 | 0,200 | 7,290 | 3,940 |
| sRANKL > 0,08 pmol/l | 3 | 3,433 | 0,902 | 2,500 | 4,300 | 3,500 |
| Grupa II (ch.L-C) | 24 | 4,313 | 1,304 | 1,800 | 7,000 | 4,290 |
| sRANKL ≤ 0,08 pmol/l | 19 | 4,541 | 1,258 | 1,800 | 7,000 | 4,400 |
| sRANKL > 0,08 pmol/l | 5 | 3,446 | 1,211 | 1,800 | 4,800 | 3,630 |
| Grupa III (K) | 51 | 3,914 | 1,722 | 0,035 | 10,20 | 3,610 |
| sRANKL ≤ 0,08 pmol/l | 49 | 3,922 | 1,755 | 0,035 | 10,20 | 3,610 |
| sRANKL > 0,08 pmol/l | 2 | 3,705 | 0,587 | 3,290 | 4,12 | 3,705 |
| Ogółem | 93 | 3,992 | 1,561 | 0,035 | 10,20 | 4,10 |



Ryc. 8. Stężenie osteoprotegeryny (OPG [pmol/l]) a stężenie sRANKL [pmol/l] u dzieci z grupy II (ch.L-C)

4.5.2.2. Stężenie sRANKL a stan odżywieni dzieci chorych z NZJ

W grupie I i II dzieci chorych (wzjg i ch.L-C), u których wartości stężenia sRANKL były wyższe niż 0,08pmol/l niedożywienie (CI< 85%) występowało statystycznie częściej niż w grupie dzieci, u których stężenie sRANKL było niższe (test χ^2 ; $\chi^2[1] = 1,34$; $p < 0,037$) (tab. 35).

Stwierdzono także, że w grupie dzieci chorych częstość występowania dodatnich wartości stężenia sRANKL była zależna od stanu odżywienia, ocenionego w oparciu o współczynnik Cole'a (CI) i częściej występowała u dzieci niedożywionych (CI 85%) (dokładny test Fishera; $p < 0,046$) (tab. 36).

Tab. 35. Częstość występowania stężenia sRANKL >0,08 pmol u dzieci chorych z grupy I i II (wzjg i ch. L-C) a niedożywienie (CI<85%)

| | CI< 85% | CI> 85% | Liczba dzieci (%) |
|--------------------------|------------|-------------|-------------------|
| Grupa I i II | 6 (14,29%) | 36 (85,71%) | 42 (100%) |
| sRANKL ≤ 0,08 pmol/l (%) | 3 (8,82%) | 31 (91,18%) | 34 (100%) |
| sRANKL > 0,08 pmol/l (%) | 3 (37,50%) | 5 (62,50%) | 8 (100%) |

Tab. 36. Częstość występowania dodatnich wartości sRANKL u dzieci chorych z grupy I i II (wzjg i ch. L-C) a niedożywienie (CI<85%)

| Grupa I i II | CI< 85% | CI> 85% | Liczba dzieci (%) |
|-----------------|-----------|-------------|-------------------|
| sRANKL=0 pmol/l | 2 (7,14%) | 26 (92,86%) | 28 (100%) |
| sRANKL >0pmol/l | 4 (28,5%) | 10 (71,5) | 14 (100%) |

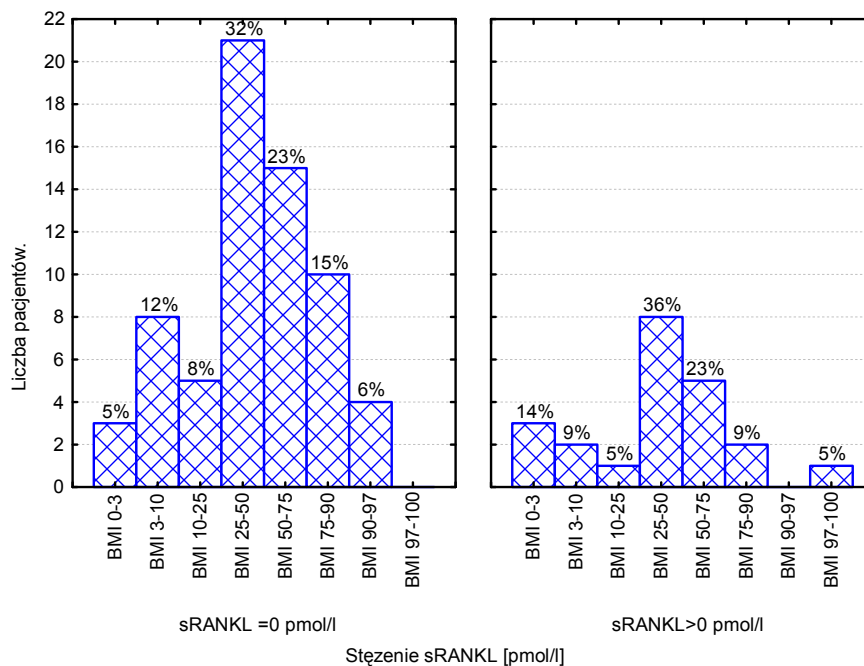
Stwierdzono, że w grupie I, dzieci z rozpoznany wzjg, u których stężenie sRANKL > 0,0 pmol/l występowanie niedożywienia było statystycznie istotne, czego nie obserwowano w grupie z nieoznaczalnym stężeniem sRANKL (test porównania przekroczeń 5%; $N = 2$, $N_\alpha = 2$, $p < 0,023$; $N = 0$, $N_\alpha = 3$, $p < 0,024$) (tab. 37). Podobna zależność nie występowała w grupie II, u dzieci z ch.L-C.

Tab. 37. Częstość występowania niedożywienia (CI<85%) u dzieci z grupy I (wzjg), a

stężenie sRANKL [pmol/l].

| Grupa I (wzjg) | CI<85% | CI>85% | Liczba dzieci (%) |
|------------------|------------|--------------|-------------------|
| sRANKL=0 pmol/l | 0 (0,00%) | 13 (100,00%) | 13 (100%) |
| sRANKL >0 pmol/l | 2 (40,00%) | 3 (60,00%) | 5 (100%) |
| Liczba dzieci | 2(11,11%) | 16 (88,89%) | 18 (100%) |

Częstość występowania dodatnich wartości stężenia sRANKL w zestawieniu z wartościami centylowymi dla BMI dzieci z NZJ, w grupie I i II, przedstawia rycina 9.



Ryc. 9. Procentowy rozkład występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych stężeń sRANKL u dzieci chorych (wzjg, ch.L-C) z uwzględnieniem centylowych wartości BMI

4.5.2.3. Stężenie sRANKL a badania laboratoryjne w grupie dzieci z NZJ

Nie stwierdzono różnicy w częstości występowania oznaczalnych wartości sRANKL u dzieci chorych z prawidłowym i przyspieszonym opadaniem krwinek czerwonych (OB) ($p=0,94$).

U dzieci z prawidłowym stężeniem białka C-reaktywnego (CRP) stężenie sRANKL > 0 pmol/l występowało statystycznie częściej niż u dzieci z podwyższonymi wartościami

CRP (test porównania przekroczeń 5%; $N = 13$, $N_{\alpha} = 5$, $p < 0,026$; $N = 1$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,006$) (tab. 38).

Tab. 38. Wartości stężenia CRP [mg/l] w grupie dzieci chorych (wzjg i ch.L-C) z oznaczalnym i nieoznaczalnym stężeniem sRANKL [pmol/l]

| Stężenie CRP [mg/l] | sRANKL=0pmol/l | sRANKL>0pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|---------------------|----------------|----------------|-------------------|
| Prawidłowe (%) | 19 (59,38%) | 13 (40,63%) | 32 (100%) |
| Podwyższone (%) | 9 (90,00%) | 1 (10,00%) | 10 (100%) |
| Liczba dzieci | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

U dzieci chorych z grupy I i II (wzjg i ch.L-C), z prawidłowym stężeniem fibrynogenu oznaczalne wartości stężenia sRANKL (>0pmol/l) występowały statystycznie częściej niż w grupie dzieci chorych z podwyższonym stężeniem fibrynogenu (test porównania przekroczeń 5%; $N = 14$, $N_{\alpha} = 5$, $p < 0,020$; $N = 0$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,006$). Stwierdzono, że częstość występowania dodatniej wartości sRANKL jest zależna od częstości przekroczenia normy fibrynogenu (dokładny test Fishera, $p < 0,034$) (tab.39). Ponadto stwierdzono, że u wszystkich dzieci z grupy I i II (wzjg i ch.L-C), u których stężenie fibrynogenu było podwyższone, stężenie sRANKL było niższe niż 0,08 pmol/l (test χ^2 ML; $\chi^2[1] = 4,04$; $p < 0,044$) (tab. 40).

Tab. 39. Częstość występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych sRANKL w grupach z prawidłowym i podwyższonym stężeniem fibrynogenu

| Stężenie fibrynogenu [g/l] | sRANKL=0 pmol/l | sRANKL>0 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Prawidłowe (%) | 20 (58,82%) | 14 (41,18%) | 34 (100%) |
| Podwyższone (%) | 8 (100,00%) | 0 (0,00%) | 8 (100%) |
| Liczba dzieci | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

Tab. 40. Częstość występowania diagnostycznych wartości stężenia sRANKL [$>0,08$ pmol/l] a stężenie fibrynogenu

| Stężenie fibrynogenu [g/l] | sRANKL \leq 0,08pmol/l | sRANKL $>$ 0,08pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| Prawidłowe (%) | 26 (76,47%) | 8 (24,53%) | 34 (100%) |
| Podwyższone (%) | 8 (100,00%) | 0 (0,00%) | 8 (100%) |
| Liczba dzieci | 34 (80,95%) | 8 (19,05%) | 42 (100%) |

Nie wykazano różnic w częstości występowania oznaczalnych stężeń sRANKL u pacjentów z prawidłowymi i nieprawidłowymi wynikami badań biochemicznych dla Fe, Ca, WBC, PLT, alb, krwi utajonej w kale.

4.5.2.4. Stężenie sRANKL a aktywność choroby w grupie I i II dzieci z NZJ (wzjg i ch.L-C)

Analizując stopień aktywności poszczególnych postaci NZJ (wzjg i ch.L-C) nie stwierdzono różnic w częstości występowania dodatnich wartości stężenia sRANKL w zależności od aktywności choroby zarówno u pacjentów z grupy I (wzjg) jak i II (ch.L-C).

Stwierdzono, że u dzieci z grupy I (wzjg) z umiarkowaną postacią choroby stężenie sRANKL $>$ 0,8 pmol/l występowało statystycznie częściej (test porównania przekroczeń 5%; $N = 1$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,020$; $N = 2$, $N_{\alpha} = 2$, $p < 0,033$). W grupie II - u dzieci z nieaktywną postacią ch. L-C statystycznie częściej stężenie sRANKL $>$ 0,08 pmol/l (test porównania przekroczeń 5%; $N = 3$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,020$; $N = 2$, $N_{\alpha} = 3$, $p < 0,020$) (tab.41-42).

Tab. 41. Wartości stężenia sRANKL powyżej i poniżej 0,08 pmol/l u dzieci z grupy I w zależności od aktywności wzjg

| Aktywność wzjg | sRANKL \leq 0,08pmol/l | sRANKL $>$ 0,08pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| Łagodna (%) | 11 (91,67%) | 1 (8,33%) | 12 (100%) |
| Umiarkowana (%) | 4 (66,67%) | 2 (33,33%) | 6 (100%) |
| Liczba dzieci | 15 (83,33%) | 3 (16,67%) | 18 (100%) |

Tab. 42. Wartości stężenia sRANKL powyżej i poniżej 0,08 pmol/l u dzieci z grupy II w zależności od aktywności ch.L-C

| Aktywność ch.L-C | sRANKL \leq 0,08pmol/l | sRANKL $>$ 0,08pmol/l | Liczba |
|------------------|--------------------------|-----------------------|--------|
| | | | |

| | | | |
|-------------------|-------------|------------|------------|
| | | | dzieci (%) |
| Nie występuje (%) | 9 (75,00%) | 3 (25,00%) | 12 (100%) |
| Występuje (%) | 10 (83,33%) | 2 (16,67%) | 12 (100%) |
| Liczba dzieci | 19 (79,17%) | 5 (20,83%) | 24 (100%) |

4.5.2.5. Stężenie sRANKL a stosowane leczenie NZJ w grupie I (wzjg) i grupie II (ch.L-C)

Podjęto próbę oceny zależności między sposobami leczenia a występowaniem oznaczalnych stężeń sRANKL w surowicy badanych chorych.

Pochodne kwasu 5-amino salicylowego (5-ASA)

Nie stwierdzono zależności między występowaniem mierzalnych stężeń sRANKL a leczeniem pochodnymi 5-ASA.

Glukokortykosterydy (GKS)

Nie wykazano różnicy w częstości występowania oznaczalnych wartości sRANKL między pacjentami leczonymi i nieleczonymi glukokortykosterydami (GKS). Nie stwierdzono także związku między występowaniem mierzalnych stężeń sRANKL a czasem leczenia glukokortykosterydami, liczbą kursów sterydoterapii, sumaryczną oraz dzienną dawką GKS równoważną miligramom prednizolonu. Jednakże stwierdzono, że w grupie pacjentów, u których stężenie sRANKL nie było oznaczalne, większość chorych otrzymywała mniej kursów (0-1) w porównaniu do podgrupy pacjentów, u których stężenie sRANKL było oznaczalne (sRANKL>0) (test jednostronny χ^2 ; $\chi^2[1] = 2,93$, $p < 0,043$) (tab43).

Tab. 43. Częstość występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych stężeń sRANKL [pmol/l] w grupie dzieci chorych (wzjg i ch. L-C) a liczba stosowania kursów glukokortykosterydoterapii

| Liczba kursów GKS | RANKL =0pmol/l | RANKL >0pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------------------|----------------|----------------|-------------------|
| Liczba kursów GKS ≤ 1 | 20 (77%) | 6 (23%) | 26 (100%) |
| Liczba kursów GKS ≥ 1 | 8 (50%) | 8 (50%) | 16 (100%) |
| Liczba dzieci | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

Budezonid

Nie obserwowano różnicy w częstości występowania mierzalnych stężeń sRANKL między pacjentami leczonymi i nieleczonymi budezonidem.

Azatiopryna

Nie stwierdzono różnicy w częstości występowania dodatnich wartości sRANKL między grupą leczoną i nieleczoną azatiopryną.

U pacjentów nieleczonych azatiopryną statystycznie częściej obserwowano stężenie sRANKL > 0,08 pmol/l (test porównania przekroczeń 5%; N = 5, N_α = 3, p < 0,043; N = 3, N_α = 4, p < 0,039) (tab. 44).

Tab. 44. Częstość występowania diagnostycznych wartości stężeń sRANKL, tj. powyżej 0,08 pmol/l w grupie dzieci chorych (wzjg i ch. L-C) a leczenie azatiopryną

| Leczenie azatiopryną | sRANKL ≤ 0,08 pmol/l | sRANKL > 0,08 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Nie stosowano (%) | 11 (68,75%) | 5 (31,25%) | 16 (100%) |
| Stosowano (%) | 23 (88,46%) | 3 (11,54%) | 26 (100%) |
| Liczba dzieci | 34 (80,96%) | 8 (19,04%) | 42 (100%) |

Podsumowanie analiz dotyczących związku między leczeniem pochodnymi 5-ASA, azatiopryną oraz budezonidem, a częstością występowania dodatnich wartości sRANKL przedstawia tabela 45.

Tab. 45. Częstość występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych wartości stężeń sRANKL [pmol/l] w grupie dzieci chorych leczonych pochodnymi 5-ASA, budezonidem i azatiopryną

| Leczenie | sRANKL >0 pmol/l | sRANKL =0 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| 5-ASA (%) | 26 (65,00%) | 14 (35,00%) | 40 (100%) |
| Budezonid (%) | 7 (32,00%) | 4 (68,00%) | 11 (100%) |
| Azatiopryna (%) | 18 (69,23%) | 8 (30,77%) | 26 (100%) |

Cyklosporyna A

Tylko u jednego dziecka leczonego cyklosporyną A stężenie sRANKL było oznaczalne. Stwierdzono jednocześnie, że w grupie nieleczonej CSA stężenie

sRANKL>0 pmol/l występowało w sposób statystycznie znamienney (test porównania przekroczeń 5%; N = 13, N_α = 5, p < 0,026; N = 1, N_α = 3, p < 0,044) (tab.48).

Tab. 46. Częstość występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych wartości stężenia sRANKL [pmol/l] u dzieci chorych a leczenie cyklosporyną

| Terapia cyklosporyną | sRANKL =0 pmol/l | sRANKL >0 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|----------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Niestosowana (%) | 22 (62,86%) | 13 (37,14%) | 35 100% |
| Stosowana (%) | 6 (85,71%) | 1 (14,29%) | 7 (100%) |
| Liczba dzieci | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

Infliximab

Stwierdzono, że w grupie dzieci chorych, pacjenci nieleczeni biologicznie mieli znamienne częściej stężenie sRANKL wyższe niż 0,08pmol/l (test porównania przekroczeń 5%; N = 8, N_α = 5, p < 0,026; N = 0, N_α = 3, p < 0,006) (tab. 47.)

Wartości stężenia sRANKL>0 pmol/l występowały w sposób statystycznie znamienney u dzieci nieleczonych biologicznie, czego nie obserwowano w grupie leczonej Infliximabem (test porównania przekroczeń 5%; N = 13, N_α = 5, p < 0,026; N = 1, N_α = 3, p < 0,006) (tab.48).

Tab. 47. Stężenie sRANKL [pmol/l] a leczenie biologiczne Infliximabem

| Infliximab | sRANKL ≤ 0,08pmol/l | sRANKL >0,08pmol/l | Ogółem |
|----------------|---------------------|--------------------|-----------|
| Nieleczeni (%) | 26 (76,47%) | 8 (23,53%) | 34 (100) |
| Leczeni (%) | 8 (100,00%) | 0 (0,00%) | 8 (100%) |
| Liczba dzieci | 34 (80,96%) | 8 (19,04%) | 42 (100%) |

Tab. 48. Częstość występowania oznaczalnych i nieoznaczalnych wartości stężeń sRANKL [pmol/l] u dzieci w zależności od leczenia Infliximabem

| Infliximab | sRANKL =0 pmol/l | sRANKL >0 pmol/l | Ogółem |
|------------|------------------|------------------|--------|
|------------|------------------|------------------|--------|

| | | | |
|----------------|-------------|-------------|-----------|
| Nieleczeni (%) | 21 (61,76%) | 13 (38,24%) | 34 (100%) |
| Leczeni (%) | 7 (87,50%) | 1 (12,50%) | 8 (100%) |
| Ogółem | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

Leczenie żywieniowe

Częstość występowania dodatnich wartości sRANKL była różna w zależności od stosowanego leczenia żywieniowego. U dzieci chorych, nieżywionych dojelitowo przez zgłębnik dożołądkowy (NGT), wartości stężenia sRANKL > 0,08 pmol/l występowały statystycznie częściej niż w grupie dzieci żywionej w ten sposób (Test porównania przekroczeń 5%; N = 7, N_α = 5, p < 0,029; N = 1, N_α = 2, p < 0,044) (tab.49).

Nie stwierdzono różnic w częstości występowania oznaczalnych wartości stężeń sRANKL między dziećmi żywionymi paraenteralnie, a tymi, u których nie stosowano tej formy żywienia.

Tab. 49. Częstość występowania wartości stężenia sRANKL powyżej i poniżej 0,08pmol/l u dzieci chorych z grupy I i II a leczenie żywieniowe przez zgłębnik dożołądkowy (NGT)

| NGT | sRANKL ≤ 0,08 pmol/l | sRANKL > 0,08 pmol/l | Liczba dzieci (%) |
|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Nie stosowano (%) | 28 (80,00%) | 7 (20,00%) | 35 (100%) |
| Stosowano (%) | 6 (85,71%) | 1 (14,29%) | 7 (100%) |
| Liczba dzieci | 28 (66,67%) | 14 (33,33%) | 42 (100%) |

4.5.2.6. Stężenie sRANKL a gęstość mineralna kości u dzieci w grupie I (wzjg) i grupie II (ch.L-C)

Oceniano związek między stężeniem sRANKL a gęstością mineralną kości (BMD). Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w częstości występowania oznaczalnych wartości stężenia sRANKL u dzieci chorych (wzjg i ch.L-C) z obniżoną i prawidłową BMD. Stwierdzono, że w grupie dzieci chorych (wzjg i ch.L-C), u których stężenie sRANKL było niższe niż 0,08 pmol/l częstość przekroczenia wartości Z-score L1-L4 poniżej -2,0 występowała statystycznie częściej niż w grupie dzieci chorych ze stężeniem sRANKL powyżej 0,08 pmol/l (test porównania przekroczeń 5%; N = 11,

$N_{\alpha} = 5$, $p < 0,020$; $N = 1$, $N_{\alpha} = 2$, $p < 0,032$) (tab.50).

Tab. 50. Częstość występowania wartości stężenia sRANKL > 0,08 pmol/l w grupie dzieci chorych (grupa I i II) z prawidłową i niższą niż oczekiwana dla wieku wartością Z-score L1-L4

| Stężenie sRANKL | Z-score L1-L4 poniżej - 2,0 | Z-score L1-L4 powyżej - 2,0 | Liczba dzieci (%) |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Poniżej 0,08 pmol/l (%) | 11 (32,36%) | 23 (67,64%) | 34 (100%) |
| Powyżej 0,08 pmol/l (%) | 1 (12,0%) | 7 (87,50%) | 8 (100%) |
| Liczba dzieci | 12 (31,57%) | 28 (68,43%) | 38 (100%) |

4.6 . Podsumowanie wyników:

1. Niedożywienie (CI<85%) w grupie dzieci chorych występowało w sposób statystycznie znamieny ($p < 0,04$). Częściej u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna niż u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego ($p < 0,01$).
2. U dziewczynek częściej zdiagnozowano chorobę Leśniowskiego – Crohna ($p < 0,02$).
3. Obniżoną gęstość mineralną kości, wyrażoną jako Z-score mniejszy od -2,0, stwierdzono u 29,17% dzieci z ch.L-C i u 27,78% chorych z wzjg.
4. Chore dziewczynki miały częściej niż chłopcy średni Z-score w granicach wartości oczekiwanych dla wieku ($p < 0,036$).
5. Nie stwierdzono znamiennej różnicy w stężeniu osteoprotegeryny (OPG) między dziećmi chorymi a zdrowymi.
6. Wyższe stężenie OPG statystycznie częściej występowało u zdrowych chłopców niż u zdrowych dziewczynek ($p=0,036$).
7. Stężenia OPG były niższe u dzieci z aktywną postacią choroby Leśniowskiego - Crohna ($p < 0,01$) i postacią umiarkowaną wrzodziejącego zapalenia jelit ($p < 0,01$) niż u dzieci z, odpowiednio, nieaktywną i łagodną postacią tych jednostek chorobowych.
8. Stężenie liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (sRANKL) występowało bardzo często poniżej możliwości diagnostycznych testu.
9. Oznaczalne, a wśród nich także wyższe, wartości stężenia sRANKL występowały częściej u dzieci chorych niż zdrowych ($p < 0,02$).
10. Oznaczalne wartości stężenia sRANKL występowały częściej u chłopców niż u dziewczynek z grupy dzieci chorych z NZJ ($p < 0,01$).
11. U dzieci chorych z ch.L-C stwierdzono znamienne, odwrotną zależność między stężeniem OPG a stężeniem sRANKL ($p<0,048$).
12. Częstość występowania dodatnich wartości sRANKL była zależna od stanu odżywienia i zależność ta była znacząca u dzieci niedożywionych ($p < 0,04$).
13. U dzieci chorych z NZJ, u których stężenie fibrynogenu było podwyższone, stwierdzono znamienne częściej niższe wartości stężenia sRANKL ($p < 0,044$).
14. U dzieci chorych z grupy I, z umiarkowaną postacią wzjg, stwierdzono istotnie częściej wyższe stężenie sRANKL ($p < 0,03$). Pacjenci z grupy II i nieaktywną postacią ch. L-C miały częściej wyższe wartości stężenia sRANKL ($p < 0,02$).
15. Wartości stężenia sRANKL $> 0,08$ pmol/l częściej występowały u dzieci leczonych

metodą żywienia dojelitowego przez zgłębnik ($p < 0,04$).

16. Wartości stężenia sRANKL $< 0,08$ pmol/l wyznaczono częściej u dzieci nieleczonych biologicznie ($p < 0,006$) i nieleczonych CSA ($p < 0,04$). Wartości stężenia sRANKL $> 0,08$ pmol/l występowały częściej u dzieci leczonych azatiopryną ($p < 0,03$).

17. W grupie dzieci z obniżoną gęstością mineralną kości częściej występowały niższe wartości sRANKL (poniżej 0,08 pmol/l) ($p < 0,03$).

18. Prawidłowo odżywione dzieci chore miały częściej prawidłową gęstość kości.

19. U dzieci leczonych budezonidem znacząco rzadziej obserwowano obniżoną gęstość mineralną kości ($p < 0,006$).

5. DYSKUSJA

Ogromny postęp, jakiego świadkami jesteśmy praktycznie codziennie, stwarza możliwości szczegółowego rozpoznawania i nowoczesnego leczenia wielu jednostek i zespołów chorobowych.

Złożoność czynników predysponujących do występowania wielu chorób, wpływających na ich przebieg oraz niejednokrotnie tylko empiryczne metody leczenia poddają dyskusji, czy niektóre z obserwowanych, współistniejących, patologii są wyrazem powikłań toczącej się choroby, skutkiem ubocznym stosowanej terapii czy może chorobą per se.

W nieswoistych procesach zapalnych jelit, poza problemami wynikającymi z samej choroby podstawowej, poważne wyzwanie stanowią jej powikłania. Jednym z nich są zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej. Wobec niepokojącego zjawiska, jakim jest obserwowana coraz większa zapadalność na nieswoiste zapalenia jelit wśród dzieci, również w najmłodszych grupach wiekowych [76, 77, 84], zaburzenia mineralizacji kości stają się problemem nie tylko internistycznym, ale również pediatrycznym.

Chorobą szkieletu, w której, w skutek zaburzeń mikroarchitektury kości dochodzi do zmniejszenia jej wytrzymałości, jest osteoporoza. Wiąże się ona ze zwiększonym ryzykiem złamań kości, co stanowi istotny problem kliniczny.

Pierwsze obserwacje pochodzą już z XIX w., natomiast w 1940 r. *Fuller Albright* opisał osteoporozę, jako chorobę wynikającą z niedoboru estrogenów u kobiet po menopauzie [154, 155]. Obecnie wiadomo, że etiopatogeneza osteoporozy jest znacznie bardziej złożona. Niewątpliwy jest udział czynników genetycznych i aktywności hormonalnej (zwłaszcza hormonów płciowych i glukokortykosteroidów). Istotne znaczenie mają także wiek, płeć, rasa, współistnienie chorób przewlekłych (zwłaszcza zapalnych), niektóre leki, stan odżywienia oraz styl życia, zwłaszcza aktywność fizyczna i stosowane używki [17, 156].

Gęstość mineralna kości (BMD) w wieku dorosłym uwarunkowana jest osiąganą pod koniec drugiej dekady życia szczytową masą kostną (PBM) [17, 157]. U dzieci, zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej, ściślej, jej mineralizacji i architektury, mogą wynikać z pierwotnej patologii tkanki kostnej, częściej jednak są wtórne do innych schorzeń. Wśród nich z pewnością znajdują się choroby układu pokarmowego, zwłaszcza nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) [157].

Uwzględniając aspekty etiopatogenetyczne, mianowicie, podłoże immunologiczne i czynniki genetyczne, jak również dynamikę procesów fizjologicznych w rozwijającym się organizmie, obraz kliniczny tych chorób staje się niezwykle skomplikowany.

Identyfikacja mechanizmów, które leżą u podłoża patologii nieswoistych zapaleń jelit i osteoporozy może okazać się kluczowa dla rozpoznawania, prewencji czy leczenia tych chorób.

W oparciu o badania oceniające markery metabolizmu kostnego wyróżniono dwa typy osteoporozy. O osteoporozie z tzw. wysokim obrotem kostnym, mówimy wówczas, gdy duża aktywność osteoklastów wyraża się nasiloną resorpcją kości. Osteoporoza z tzw. niskim obrotem kostnym charakteryzuje się prawidłowym tempem resorpcji kości z jednocześnie zmniejszoną syntezą jej macierzy. Wykazano, że osteoporoza związana z przewlekłym stanem zapalnym charakteryzuje się wysokim, natomiast indukowana sterydoterapią – niskim obrotem kostnym [148, 158].

Wskazuje to, że zaburzenie metabolizmu kostnego w przebiegu NZJ – których istotą jest przewlekły proces zapalny, a sterydoterapia jedną z podstawowych metod leczniczych – ma złożony patomechanizm. Szereg badań, prowadzonych w wielu dziedzinach nauk medycznych, w tym na poziomie molekularnym, poprzez analizę roli czynników etiopatogenetycznych i metod leczenia, wyznacza nowe ścieżki diagnostyczno – terapeutyczne. Niemniej jednak, wiele kwestii wciąż pozostaje nierozwiązanych. Od ostatnich lat XX wieku ogromne nadzieje wiąże się z nowo zidentyfikowanymi glikoproteinami, o pluripotencjalnym działaniu.

W 1997 r. trzy niezależne grupy badawcze odkryły białko zaangażowane między innymi w procesy różnicowania i dojrzewania osteoklastów – osteoprotegerynę (OPG) [25, 29]. Następnie zidentyfikowano dwa inne białka: ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (RANKL) i właściwy mu receptor, obecny na powierzchni komórek (RANK) [26, 41, 159]. W kolejnych badaniach, jak zaznaczono na wstępie, stwierdzono znaczący udział tych białek w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, zwłaszcza dotyczących tkanki kostnej, ale także procesach immunologicznych – zapalnych, z autoagresji oraz nowotworowych [160-162].

Mimo coraz większej wiedzy, szczegóły dotyczące mechanizmu działania i faktycznej roli tych cytokin nadal pozostają nie w pełni poznane. Podobnie jak wciąż nie do końca jest znana etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny potencjalnego znaczenia osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B oraz poszukania zależności między nimi a wybranymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.

Jakkolwiek, badania dotyczące osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B trwają już ponad 10 lat, nadal nie ma jednoznacznych danych określających wartości „prawidłowego” ich stężenia w surowicy osób zdrowych, z uwzględnieniem płci i wieku. Dane te są niezbędne by można było oceniać zmiany w stężeniach tych glikoprotein w różnych stanach klinicznych, a tym samym wnioskować o ewentualnej ich roli w analizowanych schorzeniach. Przeprowadzone dotychczas badania dotyczyły głównie populacji osób dorosłych [40, 66, 163, 164]. Tym bardziej brakuje danych określających wartości referencyjne dla populacji pediatrycznej, dla której przecież charakterystyczny jest dynamiczny metabolizm tkanki kostnej.

W związku z powyższym w pracy własnej podjęto próbę określenia norm dla stężeń badanych cytokin w surowicy dzieci w wieku rozwojowym.

W grupie 51 zdrowych dzieci, stanowiących grupę kontrolną, stężenia OPG mieściły się w zakresie 0,03-10,2 pmol/l, średnio $3,91 \pm 1,72$ [SD] pmol/l, mediana 3,61 pmol/l. Stężenia sRANKL natomiast wahały się w granicach 0,0-0,3 pmol/l; średnio $0,02 \pm 0,047$ [SD] pmol/l.

Uzyskane wyniki oznaczeń osteoprotegeryny są zbliżone do obserwowanych przez innych badaczy analizujących ten problem [165, 166]. Jednak zakres średniego stężenia OPG jest bardzo duży – znacznie wyższe wartości w grupie kontrolnej stwierdził *Rosso* ($21,35 \pm 2,05$ pmol) [167], natomiast *Olesińska* obserwowała znacznie niższe wartości średniego stężenia OPG [168]. Należy zaznaczyć, że liczebności badanych populacji w wymienionych pracach były niewielkie [71, 167].

W pracy własnej za wartość referencyjną stężenia OPG przyjęto medianę dla grupy kontrolnej (3,61 pmol/l).

Oznaczone w niniejszej pracy wartości stężenia sRANKL, zwłaszcza w grupie kontrolnej, były bliskie zeru. Mimo że producent zestawu wykorzystanego do oznaczeń określa czułość testu dla wartości 0,08 pmol/l, w wielu przypadkach udało się oznaczyć stężenie sRANKL w przedziale między 0,00 pmol/l a 0,08 pmol/l. Z tego względu, nie było możliwe wyznaczenie wiarygodnych wartości referencyjnych dla stężenia sRANKL w surowicy dzieci.

W piśmiennictwie również dostępne są dane o małej częstości występowania oznaczalnych wartości stężenia sRANKL [169]. Interpretacja tego zjawiska nie jest jednoznaczna. W surowicy ludzi tylko znikoma część liganda RANK występuje w postaci wolnej i forma ta jest trudno oznaczalna, zwłaszcza u osób zdrowych [170]. Jakkolwiek nowe rozwiązania technologiczne zaowocowały czulszymi zestawami

analitycznymi, mierzącymi również całkowite stężenie RANKL (tj. postać wolną i w kompleksie z OPG), to jednak w chwili obecnej kliniczne doświadczenie z ich zastosowaniem jest niewielkie. Wydaje się, że umożliwią one ustalenie bardziej precyzyjnych wartości referencyjnych wymienionych cytokin w surowicy [32, 171].

Przeprowadzone w pracy analizy nie wykazały istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi – oznaczalnymi – wartościami stężenia sRANKL w surowicy u całej badanej populacji dzieci, także po uwzględnieniu wartości poniżej czułości testu tj. 0,08 pmol/l. Wobec tego, w oparciu o jedną ze standardowych technik statystycznych, dokonano procedury określenia częstości występowania dodatniej wartości sRANKL w badanych podgrupach.

Istotnych spostrzeżeń dotyczących osteoprotegeryny i liganda dla RANK w populacji dziecięcej dostarczyły badania *Buziego* [172]. Analiza dotyczyła 88 dzieci. W populacji tej były dzieci zdrowe, z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, chorobą Turnera oraz przedwczesnym dojrzewaniem płciowym. W grupie wiekowej od 4 do 14 lat średnie stężenie OPG wynosiło $3,55 \pm 0,97$ pmol/l, znamienne wyższe wartości obserwowano u dzieci młodszych – poniżej 4rż: $5,87 \pm 2,22$ pmol/l. Średnie stężenie sRANKL, badane w tej samej populacji, wynosiło $0,81 \pm 1,55$ pmol/l, z niewielką tendencją do obniżania się wraz z wiekiem. Autorzy podkreślali, że stężenia cytokin u starszych dzieci były zbliżone do wartości OPG i sRANKL oznaczanych u dorosłych [172].

Wyniki badań dotyczące ludzi dorosłych nie są jednak także jednoznaczne. *Kudlacek i wsp.*, oceniając stężenie OPG u 1134 zdrowych osób w wieku od 19 do 81 lat i starszych stwierdzili, że średnie stężenie OPG wynosiło $2,54 \pm 2,57$ pmol/l [40]. Wspomniani autorzy zaobserwowali znaczący wzrost stężenia tej glikoproteiny wraz z wiekiem: od $2,25 \pm 1,05$ pmol/l u kobiet młodszych (< 30 lat) i $3,48 \pm 3,15$ pmol/l u kobiet po menopauzie (61-70 r.ż.) do $11,3 \pm 5$ pmol/l u starszych (po 81rż). Podobne wyniki uzyskano w populacji mężczyzn – od $2,035 \pm 1,315$ pmol/l u młodszych, do $11,3 \pm 0,39$ pmol/l po 80rż. W badaniach innych autorów średnie stężenia mieściły się w szerokich granicach; dla OPG: 2,6 – 43,35 pmol/l, dla sRANKL: 0,28 - 1,1 pmol/l [36, 37, 39, 62, 173-175].

W badaniu własnym nie stwierdzono związku między stężeniem cytokin a wiekiem badanych dzieci.

Znaczna rozpiętość uzyskiwanych przez różnych autorów wyników ma z pewnością wiele przyczyn. Różnice mogą wynikać z niejednorodności badanych populacji (wiek,

pleć, grupa etniczna, liczebność) oraz różnic metodologicznych (różni producenci zestawów do oznaczeń, sposób pobierania i przechowywania krwi itp.). Nie jest także ostatecznie wyjaśniona kwestia stabilności badanych cytokin zarówno w surowicy krwi jak i osoczu [171, 176]. Stąd tak istotne są próby wyznaczania wartości referencyjnych dla określonych populacji.

Głównym celem niniejszej pracy było oznaczenie stężenia osteoprotegeryny i rozpuszczalnej formy liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy krwi dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit. Średnie stężenie OPG w badanej grupie pacjentów wyniosło $4,09 \pm 1,35$ pmol/l; sRANKL: $0,048 \pm 0,11$ pmol/l. Obserwowane wartości były wyższe niż w grupie kontrolnej. U dzieci z NZJ istotnie częściej niż w grupie kontrolnej udało się wyznaczyć wartość stężenia sRANKL, częściej u chłopców niż u dziewczynek. Nie stwierdzono różnic w stężeniu sRANKL między dziećmi z wzjg i ch.L-C. Uzyskane wyniki są zbliżone do przedstawionych w 2006 roku przez *Sylvestra* [166]. W tym, jak dotąd jedynym opublikowanym w literaturze badaniu oceniającym stężenia OPG i sRANKL u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna, średnie stężenia tych cytokin wyniosły odpowiednio $4,24 \pm 1,74$ pmol/l i $0,5 \pm 1,86$ pmol/l i były wyższe niż w grupie kontrolnej. Przedstawione natomiast na 39. sympozjum EPGHAN obserwacje *Civitelliego* i wsp., dotyczące pacjentów z NZJ, wskazują na znacznie wyższe wartości stężenia badanych cytokin niż w pracy własnej i *Sylvestra* [177].

Pojedyncze badania dotyczące omawianych białek w populacji dziecięcej przeprowadzono w mało licznych i niejednorodnych pod względem płci i diagnozy grupach. Dotyczyły one takich schorzeń jak: choroba Kawasaki, histiocytoza z komórek Langerhansa, cukrzyca typu I, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, młodzieńcza postać choroby Pageta, przewlekłe choroby nerek, zapalenie skórno – mięśniowe, zespół Turnera, nerwiak zarodkowy czy atrezja dróg żółciowych [71-73, 167, 172, 178].

U dzieci z chorobą Kawasaki stężenie OPG było znamienne wyższe niż u dzieci z grupy porównawczej (tj. zdrowych, gorączkujących oraz z młodzieńczym toczeniem rumieniowatym), nie tylko w aktywnej fazie choroby, ale także w okresie rekonwalescencji [73]. Dzieci, u których w przebiegu choroby Kawasaki rozwinęły się tętniaki naczyń wieńcowych miały wyjściowo wyższe stężenia OPG niż dzieci bez występujących powikłań naczyniowych. Stężenie OPG jako wskaźnika predykcyjnego

rozwoju tętniaków naczyń wieńcowych cechowała 100% czułość i 96% specyficzność, przy wartościach OPG większych niż 6,16 pmol/l.

Wydaje się uzasadnione rozważenie zastosowania oceny stężenia OPG jako elementu diagnostyki różnicowej dzieci z chorobami gorączkowymi, a także jako ewentualnego biomarkera rozwoju tętniaków u pacjentów z chorobą Kawasaki [73].

Również u 20 dzieci z histiocytozą komórek Langerhansa stwierdzono podwyższone stężenia OPG. Wyższe wartości u pacjentów z postacią wielonarządową pozostawały w korelacji ze stężeniem TNF- α . Poziom osteoprotegeryny był natomiast niższy u dzieci z litycznymi zmianami w kościach, w porównaniu do chorych bez zajęcia układu kostnego, chociaż różnica ta nie osiągnęła statystycznej istotności [167].

W badaniu 54 dzieci z nerwiakiem zarodkowym stwierdzono znamienne niższe średnie stężenie OPG niż u dzieci z grupy kontrolnej, bez związku ze stadium zaawansowania choroby. Jednocześnie średnie stężenie sRANKL było znamienne wyższe u chorych, zwłaszcza dzieci w IV stadium zaawansowania choroby. Stwierdzono silnie dodatnią korelację między stężeniem OPG a niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi takimi jak: stężenie ferrytyny czy neuronospecyficznej enolazy. Natomiast poziom OPG ujemnie korelował z długością przeżycia chorych, zwłaszcza z obecnymi przerzutami do kości, czyli czynnikiem o złym znaczeniu rokowniczym [72].

Biorąc pod uwagę wspomniane wyżej doniesienia oraz fakt, że osteoprotegeryna syntetyzowana jest w wielu tkankach, należy zadać pytanie: jaką rolę odgrywa OPG – czy jest wykładnikiem metabolizmu kostnego czy raczej parametrem stanu zapalnego? A może procesu autoimmunologicznego?

W związku z tym, w niniejszej pracy oceniono u dzieci z NZJ: gęstość mineralną kości, wykładniki stanu zapalnego, czas trwania choroby oraz stosowane leczenie. Następnie podjęto próbę znalezienia ewentualnej zależności tych parametrów z badanymi glikoproteinami: OPG i sRANKL.

W literaturze znajduje się szereg doniesień dotyczących występowania obniżonej gęstości mineralnej kości w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit, zarówno u pacjentów dorosłych jak i u dzieci [120, 121].

Nie ustalono, jak dotychczas, ścisłych rekomendacji dotyczących wykonywania badań densytometrycznych u chorych z NZJ. Niektórzy specjaliści zalecają wszystkim pacjentom z nieswoistymi zapaleniami jelit coroczną ocenę masy kostnej. Toczą się dyskusje, czy chorzy z obniżoną BMD mają równocześnie zwiększone ryzyko

wystąpienia złamań kości oraz czy powszechne metody terapeutyczne mogą mieć zastosowanie u chorych z NZJ [179-183].

U badanych chorych dzieci oceniano stan mineralizacji kości wykorzystując technikę absorpcjometrii podwójnej wiązki promieni rentgenowskich – DXA. Uzyskane wyniki zinterpretowane zostały zgodnie z najnowszymi, obowiązującymi standardami [131, 132].

Dzięki dostępności badania densytometrycznego, pomiar gęstości mineralnej kości u pacjentów stał się ważnym narzędziem diagnostycznym, umożliwiającym monitorowanie przebiegu osteoporozy jak i skuteczności stosowanego leczenia. Uznawana za „złoty standard” w ocenie BMD, DXA nie jest jednak metodą pozbawioną wad. Ograniczenia z nią związane są szczególnie istotne przy badaniu populacji pediatrycznej [129].

Masa kostna jest wyrażana jako zawartość mineralna kości (BMC – bone mineral content) lub gęstość mineralna kości (BMD - bone mineral density). Oba parametry zależą od rozmiaru / wielkości kości. Chociaż pomiar BMD jest przystosowany do skanowanego obszaru, nie uwzględnia jednak indywidualnie różnej objętości kości, szczególnie wzrastającego organizmu. Tak, więc, uzyskany wynik może nie odzwierciedlać w pełni faktycznej gęstości badanej kości dziecka. Podjęto próby modyfikacji metodologii w celu zminimalizowania błędów i uwzględnienia osobniczej objętości kości (g/cm³), jednak nie są one stosowane w powszechnej praktyce [184]. Innymi metodami służącymi do oceny gęstości mineralnej kości są ilościowa tomografia komputerowa (QCT) czy ultrasonografia jakościowa (QUS) [185, 186]. Także te techniki posiadają słabe strony. Ilościowa tomografia komputerowa mierzy, co prawda, objętość i gęstość mineralną kości, jednak wiąże się z dużą dawką promieniowania i małą dostępnością. Ultrasonografia jakościowa ocenia BMD obwodowych elementów szkieletu, które u dzieci ulegają ciągłym i dynamicznym zmianom mikrostruktury. Ponadto, pomiary te słabo korelują z BMD kręgosłupa lędźwiowego [187, 188].

Podkreśla się brak standaryzowanej bazy pediatrycznych danych referencyjnych dla wszystkich 3 wymienionych metod pomiaru. Najwięcej danych dostępnych jest dla DXA [189-192].

W związku z tym, właśnie tę metodę oceny masy kostnej zastosowano w pracy własnej. Za wartości referencyjne posłużyły dane pochodzące z badania populacyjnego *Lorenca*.

Jest to największa baza danych dla populacji dzieci polskich i stąd powszechnie stosowana do analizy porównawczej [153].

W opisie pomiaru BMD, zgodnie z zaleceniami interpretacji badań densytometrycznych u dzieci, zastosowano sformułowań „wartość poniżej oczekiwanej dla wieku”, gdy Z-score wynosiła mniej niż -2,0 (w miejsce używanego do niedawna pojęcia „osteoporozy”), zaś, gdy wartość ta była większa – „wartość w granicach oczekiwanej dla wieku” (zrezygnowano z terminu osteopenii) [193-195].

W badaniu własnym u ponad 25% dzieci chorych z NZJ (5 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i 7 z chorobą Leśniowskiego-Crohna) stwierdzono wartość BMD Z-score poniżej -2,0. U tych dzieci choroba trwała od 1 do 60 miesięcy, średnio 39 miesięcy. Osoby chorujące niedłużej niż 3 lata miały istotnie częściej BMD zgodną z oczekiwaną dla wieku w porównaniu z pacjentami o dłuższym czasie trwania choroby. Podobne obserwacje poczynili także inni autorzy [117, 121, 196, 197].

Wartości BMD dla poszczególnych kręgów były niższe u pacjentów z ch.L-C niż z wzjg, najniższe dla 4. kręgu lędźwiowego, nie były to jednak różnice statystycznie istotne.

W piśmiennictwie dostępne są doniesienia, w których wskazuje się na różnice wartości BMD między ch. L-C a wzjg [115, 117, 118, 198]. Oceniono, że w chorobie Leśniowskiego - Crohna osteoporoza występuje częściej, bo aż u 15%, a nawet u 40% dorosłych pacjentów [122, 199, 126]. Wg. *Ghosh* i *wsp.* zaburzenia mineralizacji kości dotyczą niemal wyłącznie chorych ch.L-C [122].

Jak wspomniano wcześniej, stwierdzono tendencję do niższej masy kostnej u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna. U tych pacjentów obserwowano również, chociaż nieistotnie statystycznie, wyższe średnie stężenie osteoprotegeryny.

Powyższe obserwacje są zgodne z danymi z piśmiennictwa [62, 74, 200].

Prawdopodobnie fakt ten można tłumaczyć tym, że w ch.L-C proces zapalny jest bardziej rozległy, dotyczy różnych odcinków przewodu pokarmowego, prowadząc często do zaburzeń wchłaniania. Obserwacja ta koresponduje z koncepcją, że wzmożona synteza OPG jest wyrazem kompensacyjnej reakcji organizmu na potencjalnie negatywny wpływ procesu zapalnego na tkankę kostną, a ściślej, na jej metabolizm [179]. Mechanizm ten ma na celu ochronę tkanki kostnej przed postępującą jej degradacją. Jednocześnie pozostaje to w zgodności z obserwowaną mniejszą częstością występowania oznaczalnych wartości sRANKL u tych chorych. W skutek wzmożonej syntezy osteoprotegeryny większa pula RANKL ulega związaniu przez

jego rozpuszczalny receptor (OPG). Dzięki temu ligand RANK w mniejszym stopniu wiąże się z swoim innym receptorem – obecnym na powierzchni komórek zaangażowanych w proces resorpcji kości.

Jak zaznaczono wcześniej, istotny jest nie sam fakt obniżonej wartości BMD, odzwierciedlającej mniejszą masę kostną, ale konsekwencje z tego płynące tj. mniejsza wytrzymałość i związane z tym większe ryzyko złamań kości.

U żadnego z badanych dzieci z NZJ, mimo obserwowanej u niektórych obniżonej BMD, nie stwierdzono złamań kości. Podobnie *Persad i wsp.* nie obserwowali, aby złamania kości u dzieci z NZJ występowały częściej niż u ich zdrowego rodzeństwa [201].

Opublikowane wyniki dużych badań populacyjnych osób dorosłych wskazują, że ryzyko złamań kości u pacjentów z NZJ było podobne jak u osób z grupy kontrolnej [202, 203]. Badacze duńscy natomiast stwierdzili, że było ono wyższe tylko u pacjentów chorujących na ch.L-C, a nie na wzjg oraz u kobiet zarówno przed jak i po menopauzie. Ryzyko zwiększała obecność złamań u matki i palenie tytoniu przez pacjentów [180].

U wszystkich włączonych do niniejszego badania pacjentów wywiad osobniczy w kierunku palenia tytoniu oraz patologicznych złamań u rodziców był negatywny.

Klaus i wsp. poczynili bardzo interesujące obserwacje [204]. Wśród badanych 293 pacjentów z NZJ, 35%, u których wystąpiło złamanie, było w wieku poniżej 30 lat, a u 38% wystąpienie złamania korelowało z BMD odpowiadającą osteoporozie. Wskazuje to wyraźnie, że nie sama BMD jest czynnikiem prognostycznym i co więcej - markerem ryzyka złamań. Inni autorzy oceniali BMD osiąganą przez dorosłych, u których choroba (NZJ) zaczęła się przed 20. rokiem życia. Średnia wartość BMD była podobna jak w grupie kontrolnej, a tylko u 3% chorych odpowiadała wartościom pozwalającym rozpoznać osteoporozę [205].

Na podstawie danych z piśmiennictwa można wnioskować, że dzieci z NZJ mają szansę osiągnąć właściwą mineralizację kości jako osoby dorosłe. Nawet, jeżeli mają one zaburzoną mineralizację kości, to prawdopodobnie w okresach remisji choroby, dochodzi do normalizacji masy kostnej [205]. Jest to, jak się wydaje, kolejny argument przemawiający za koniecznością szybkiej diagnostyki, a następnie leczenia i utrzymywania choroby w remisji.

W badaniu własnym zaobserwowano, że dzieci z dłuższym okresem trwania choroby miały częściej obniżoną masę kostną, jednak nie było to istotne statystycznie.

Jednocześnie stwierdzono, że u 25% dzieci chorych, u których BMD Z-score miała wartości poniżej oczekiwanej dla wieku, aktywność choroby była oceniona na umiarkowaną, pozostałych 75% osób miało lekką lub nieaktywną postać choroby. Ponadto, wszyscy pacjenci oceniali swoje samopoczucie jako dobre, u 25% parametry stanu zapalnego były jedynie miernie podwyższone. Podobnie w innych badaniach nie stwierdzano związku między BMD a aktywnością choroby Leśniowskiego - Crohna wyrażoną w skali PCDAI [206-208].

Jednym z wykładników aktywności i rozległości nieswoistych zapaleń jelit jest stan odżywienia. Stanowi on element analizowany w ocenie punktowej aktywności ch.L-C i wzjg. Z drugiej zaś strony, upośledzenie odżywienia organizmu może wynikać z zaburzeń wchłaniania substancji odżywczych w odcinkach jelita objętych procesem zapalnym. Jednocześnie niedobory substancji mineralnych i witamin - zwłaszcza wapnia, fosforanów i witaminy D₃, upośledzają mineralizację kości [209, 210].

Stan odżywienia jest jednocześnie jednym z ważniejszych, niezależnych parametrów mogących wpływać na wartość BMD. Interpretując zmierzoną masę kostną należy bezwzględnie ten parametr uwzględnić [207, 208, 211].

W pracy własnej niedożywienie wyrażone współczynnikiem Cole'a statystycznie częściej występowało w grupie dzieci chorych niż zdrowych, zwłaszcza u pacjentów z ch.L-C. Nie znaleziono istotnej zależności między BMD a stopniem odżywienia, chociaż częściej BMD była prawidłowa u dzieci właściwie odżywionych. Dane z piśmiennictwa na ten temat nie są jednoznaczne [196, 200, 207, 212]. Należy podkreślić również, że w pracy własnej, u dzieci niedożywionych, znacząco częściej obserwowano mieralne stężenia sRANKL.

Patomechanizm niedożywienia w przebiegu NZJ jest z pewnością złożony – od braku łaknienia po zaburzenia trawienia i wchłaniania włącznie. Zaburzenia odżywiania w sposób pośredni, więc, wyrażają nasilenie podstawowego procesu chorobowego [213, 214].

Dokonane w badaniu własnym obserwacje dotyczące częstszego występowania oznaczalnych wartości sRANKL u dzieci niedożywionych i z obniżoną BMD zgodnie korespondują z takim założeniem. Ponadto, wartości stężenia osteoprotegeryny były niższe u pacjentów z aktywną chorobą Leśniowskiego - Crohna i umiarkowaną postacią wrzodziejącego zapalenia jelita grubego niż u dzieci odpowiednio: z nieaktywnym i łagodnym procesem chorobowym.

Na tym etapie nie można jednak w sposób jednoznaczny określić, czy zachodzi związek przyczynowy między aktywnością procesu chorobowego a badanymi białkami.

Niekwestionowana konieczność kontroli aktywności choroby uzyskiwana jest dzięki stosowanemu leczeniu NZJ.

W związku z tym, w kolejnym etapie niniejszej pracy, analizowano zastosowaną terapię u chorych na NZJ.

Podstawą empirycznego leczenia nieswoistych zapaleń jelit są, obok glukokortykosterydów (GKS), pochodne kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) a także, w zaostrzeniach oraz wobec oporności na standardowe leczenie, azatiopryna (AZA) i ewentualnie inne leki immunosupresyjne – 6-merkaptopuryna (6MPM), cyklosporyna (CsA), a ostatnio także leczenie biologiczne. Uznany elementem terapii jest także leczenie żywieniowe [102].

W niniejszym badaniu, 40 chorych dzieci z NZJ (18 z wzjg i 22 z ch.L-C) było leczonych glukokortykosterydami, z czego 90% sterydami o działaniu ogólnoustrojowym i 27,5 % dzieci (11) budezonidem, któremu przypisuje się minimalne działanie ogólnoustrojowe, a tym samym i niepożądane skutki uboczne [148, 215].

U 2 z tych dzieci (5%) budezonid był wyłącznym glukokortykosterydem stosowanym w terapii. Należy podkreślić, że stosowane dawki były zindywidualizowane, odpowiednie do masy ciała pacjenta i zgodne z przyjętym schematem postępowania zależnym od stopnia zaawansowania choroby.

Szczegółowa analiza prowadzonego leczenia wykazała, że w zależności o etapu leczenia, dzienna dawka ekwiwalentu prednizolonu u poszczególnych dzieci mieściła się w granicach 2,5-60 mg, średnio 39 mg (wyższe dawki stosowano w fazie ostrej, redukując je po uzyskaniu remisji). Wyjątek stanowili pojedynczy pacjenci, którym ze względu na stan kliniczny konieczne było podawanie leków w tzw. bolusach. Ten ostatni sposób sterydoterapii, dla uproszczenia, w niniejszym badaniu został poddany analizie łącznie z ogólnoustrojowymi GKS podawanymi doustnie, w dawce równoważnej miligramom prednizolonu. Liczba kursów terapii sterydami mieściła się w przedziale 0 - 4, a średni czas trwania leczenia 194 dni. Nie stwierdzono istotnej zależności między stężeniami OPG i sRANKL a glukokortykoterapią w żadnym z ocenianych kryteriów: czasem trwania leczenia, okresem, jaki minął od jego

zakończenia czy dawką (mg) podanych leków hormonalnych. Nie stwierdzono także związku między leczeniem glukokortykosterydami, a stanem mineralizacji kości.

W niniejszym badaniu dzieci chore, u których wartość BMD Z-score L1-L4 była poniżej -2,0, z wyjątkiem jednego chłopca, były leczone GKS o działaniu uogólnionym. Ponadto wszystkie otrzymywały pochodne 5-ASA. Około 65% dzieci z tej grupy dodatkowo było leczonych azatiopryną, 16,7% budezonidem, 16,7% infliximabem, a 8,3% (1 dziecko) metotreksatem.

W grupie dzieci leczonych budezonidem, u 4 (36%) stężenie sRANKL było oznaczalne, a u 2 dzieci (18,2%) wartość BMD Z-score L1-L4 była poniżej oczekiwanej dla wieku. *Schoon i wsp.* wykazali, że stosowanie doustne budezonidu wiąże się z mniejszą ilością skutków ubocznych sterydoterapii w porównaniu z prednizolonem. Mniej wyrażone niekorzystne działanie na tkankę kostną tj. mniejszego stopnia obniżenie BMD, odnotowano w grupie pacjentów, którzy nigdy wcześniej nie otrzymywali sterydów w leczeniu (ang. steroid naive) [148, 215].

Uwagi wymaga przypadek chłopca, u którego chorobę Leśniowskiego -Crohna rozpoznano w 15 r.ż., rok przed włączeniem do badania. Pierwsze objawy choroby pojawiły się prawdopodobnie już w wieku 13 lat. Chłopiec nigdy nie otrzymywał sterydów o działaniu ogólnoustrojowym, był leczony budezonidem i żywiony dojelitowo przez zgłębnik dożołądkowy. Stwierdzono u niego wartość BMD Z-score L1-L4 poniżej -2,0 i niedobór masy ciała. Wyniki badań laboratoryjnych wykazały stężenie OPG równe 5,6 pmol/l. Poziom sRANKL nie był oznaczalny, zaś stężenie fibrynogenu znacznie podwyższone.

Zaprezentowany powyżej pacjent, co prawda, w pewnym stopniu, nie potwierdza wniosków postawionych przez *Schoona*, to jednak przemawia za koncepcją, że terapia GKS nie musi być najważniejszym czynnikiem determinującym metabolizm kostny w przewlekłym procesie zapalnym jelit [206].

Działanie glukokortykosterydów jest plejotropowe. Obok bezpośredniego wpływu na osteoklasty i osteoblasty (odpowiednio poprzez wzmożenie i zmniejszenie aktywności biologicznej tych komórek), sterydy oddziałują na szkielet również w sposób pośredni. Zmniejszając wchłanianie wapnia i fosforanów w jelicie, prowadzą do wtórnego zwiększenia sekrecji PTH; hamują syntezę i wydzielanie endogennych hormonów sterydowych, a także kolagenu typu 1 i białek niekolagenowych [216, 217]. Wiadomo również, że sterydy hamują aktywność czynników wzrostu (np. insulinopodobnego czynnika wzrostu- IGF-1, transformującego czynnika wzrostu -TGF

β), co także prowadzi do utraty masy kostnej [218-226]. Nie bez znaczenia jest również wpływ steroidów na układ mięśniowy - poprzez nasilenie katabolizmu białek osłabiają masę mięśniową. Frost, twórca teorii „mechanostatu”, podaje, że masa układu szkieletowego zależy od mechanicznych obciążeń wywieranych na kości między innymi przez mięśnie [13, 14]. W myśl tej koncepcji, jest to, więc, kolejny możliwy mechanizm negatywnego wpływu GKS na kondycję tkanki kostnej. Podsumowując, można przyjąć, że glukokortykosterydy hamują tworzenie i nasilają resorpcję kości. Jednak dokładny mechanizm sterydozależnej resorpcji kości długo pozostawał niewyjaśniony.

Wraz z odkryciem triady OPG-RANKL-RANK uzyskano odpowiedź na wiele z nurtujących pytań dotyczących procesów mineralizacji kości w stanach zdrowia i choroby oraz w czasie leczenia glukokortykosterydami.

Badając *in vitro* wpływ deksametazonu na różne komórki ludzkie (human fetal osteoblastic cell line - hFOB, human marrow stromal cells - hMS, osteosarcoma) wykazano, że hormon ten hamuje syntezę OPG, a promuje produkcję RANKL na poziomie transkrypcji. Testosteron i estrogeny były pozbawione takiego działania [124, 125, 227].

Stwierdzono ponadto, że w drugim tygodniu leczenia glukokortykosterydami aktywnej postaci ch.L-C stężenie OPG w surowicy uległo obniżeniu; w 12 tyg po zakończeniu leczenia powróciło do wartości wyjściowej [228]. Obserwacja ta jest zgodna ze stwierdzeniem, że największe ryzyko złamań kości występuje na początku terapii, a towarzyszy temu zwiększona produkcja RANKL [229, 230].

Zdecydowana większość badaczy udowodniła negatywny wpływ glukokortykosterydoterapii na BMD [119, 121, 197, 231-236]. Dotyczyło to czasu trwania leczenia, kumulacyjnej dawki leków [118, 119, 198, 200, 237], ilości kursów [206, 238], a także zależało od płci chorych [197, 235]. Jednakże, w pojedynczych analizach obserwacje były odmienne [113, 117, 120, 122, 239, 240].

W pracy własnej, jak podano wcześniej, nie stwierdzono związku między leczeniem glukokortykosterydami, a stężeniem osteoprotegeryny i liganda RANK. Nie wykazano również zależności między terapią GKS, a stopniem mineralizacji kości u badanych dzieci. Powyższe obserwacje są zgodne z doniesieniem autorów szwedzkich z 2009 roku [241].

Leonard i wsp. w badaniu pacjentów z zespołem nerczycowym sterydowrażliwym, otrzymujących leki w średniej dawce równoważnej 23000mg

encortonu stwierdzili, że wartość BMC w odcinku lędźwiowym kręgosłupa była porównywalna z grupą kontrolną. Po uwzględnieniu wzrostu pacjentów była wręcz znacząco większa. Jednocześnie u tych pacjentów stwierdzono znacznie większe wartości BMI - również często obserwowane zjawisko u pacjentów w czasie sterydoterapii [242].

W analizach własnych średnia łączna dawka glukokortykosterydów wynosiła 6701mg. Dzieci chore z grupy I i II miały tendencję do mniejszej masy ciała w porównaniu z grupą kontrolną. Wydaje się, że upośledzenie stanu odżywienia, związane z chorobą podstawową badanych dzieci (wzjg, ch.L-C), niweluje wzrost masy ciała wynikający ze stosowanej sterydoterapii.

Sambrook i wsp. próbowali określić „bezpieczną” dawkę sterydów, która stosowana w leczeniu wywierałaby minimalne działanie uboczne na tkankę kostną. Wyniki badania dowodzą niewielkiego wpływu dziennej dawki GKS mniejszej od 10mg na proces mineralizacji kości [243].

Z kolei *Cohran* podaje, że dzienna dawka równoważna 5 mg prednizonu nie stanowi czynnika ryzyka obniżenia BMD dla większości dzieci i młodzieży. Wyjątek w badanej grupie chorych stanowili pacjenci z ch.L-C, u których nawet taka dawka GKS korelowała negatywnie z BMD [244].

W niniejszym badaniu, średnia dawka dzienna GKS, jaką podano pacjentom w ramach leczenia, była równoważna 39mg prednizolonu, a więc znacznie przekraczała wartość uznaną przez *Sambrooka* za „bezpieczną”. Nie obserwowano, aby zachodził związek między dawką sterydów (dzienna i sumaryczna), a stężeniami badanych białek (OPG, sRANKL) czy gęstością mineralną kości. W świetle przytoczonych wcześniej doniesień wyniki te są dość zaskakujące.

Tym bardziej uzasadnione staje się pytanie o wpływ, jaki wywierają egzogenne glukokortykosterydy na tkankę kostną.

Interesujących wyników dostarczyły badania *Sylvestra* [166, 208]. U ponad 20 dzieci z rozpoznaną chorobą Leśniowskiego - Crohna gęstość mineralna kości i stan odżywienia były porównywalne z dziećmi z grupy kontrolnej. Badania biochemiczne wykazały jednak, że u dzieci chorych obrót kostny był mniejszy niż w grupie kontrolnej. Stężenie OPG było wyższe, a stężenie sRANKL niższe u dzieci chorych niż zdrowych. W innym, prospektywnym badaniu tych autorów, u 43% dzieci z ch.L-C w chwili zdiagnozowania NZJ, jeszcze przed włączeniem leczenia, gęstość mineralna kości była obniżona. Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy między dziećmi z ch. L-C a

pacjentami z wzjg. Zarówno markery tworzenia jak i niszczenia kości były obniżone. W okresie 2 lat obserwowano zwiększenie aktywności osteoblastów, przy stabilnym poziomie wykładników aktywności osteoklastów. Zjawisku temu towarzyszyła poprawa mineralizacji kości jedynie u dzieci z wzjg [208].

Cytowane powyżej badania pozwalają na wysunięcie wniosków, iż sama choroba, nie tylko stosowane leczenie, może wpływać na stan mineralizacji kości.

Dwie analizowane jednostki chorobowe – wzjg i ch.L-C, mimo iż obie są nieswoistymi przewlekłymi procesami zapalnymi jelit, pod wieloma względami podobnymi, różnią się w wielu aspektach. Dotyczy to między innymi mineralizacji kości [133].

Badanie własne wydaje się potwierdzać ten pogląd. Ilustracją może być dwójka analizowanych w pracy pacjentów: dziewczynka (16 lat) z ch.L-C, u której rozpoznanie ustalono 56 miesięcy przed włączeniem do niniejszego badania i chłopiec (17 lat) z rozpoznaniem 6 miesięcy wcześniej wzjg. Pacjentka ta, mimo długiego czasu trwania choroby, miała prawidłową BMD, zaś u pacjenta BMD była poniżej wartości oczekiwanej dla wieku.

Sylvester i wsp. stwierdzili, że u dzieci w chwili rozpoznania choroby Leśniowskiego - Crohna obrót kostny jest zmniejszony, tj. osteoblasty wykazują mniejszą aktywność. Z publikacji dotyczących chorych dorosłych wynika natomiast, że u tych pacjentów ma miejsce nasilona resorpcja kości [234, 240, 245]. Wydaje się, więc, że wyników uzyskanych w tej grupie wiekowej nie można w prosty sposób ekstrapolować na populację pediatryczną.

Konieczne są tym samym dalsze badania dotyczące dzieci.

Leonard i wsp. opisali różny wpływ systemowej sterydoterapii u dzieci z chorobą Leśniowskiego - Crohna i w zespole nerczycowym sterydowrażliwym (ZN) [246]. U chorych z ch.L-C stwierdzono znacząco niższe: BMI i BMC całego szkieletu, podczas gdy u dzieci z ZN – wartości BMI były większe, a BMC kręgosłupa – prawidłowa, w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy zaproponowali, by ZN uznać za chorobę, w której stosowana jest systemowa sterydoterapia, przy nieobecnych układowym stanie zapalnym, inaczej niż ma to miejsce w ch.L-C [246]. Przyjęcie takiego modelu umożliwi ocenę wpływu terapii glukokortykosterydami na układ szkieletowy, eliminując ewentualny wpływ toczącego się uogólnionego procesu zapalnego.

W badaniu własnym, wśród 12 chorych dzieci, u których BMD była poniżej wartości oczekiwanej dla wieku, znajdowała się 15 letnia dziewczynka, u której 23 miesiące wcześniej rozpoznano chorobę Leśniowskiego - Crohna. Leczenie sterydami zakończono u niej 153 dni przed włączeniem do analizy (1 kurs, łączna dawka równoważna 2660mg prednizolonu). W dniu badania pacjentka czuła się dobrze; aktywność choroby oceniono jako łagodną. Wyniki badań dodatkowych ujawniły 5-krotnie podwyższone stężenie CRP (w stosunku do normy) i stężenie OPG równe 5,6 pmol/l, sRANKL 0,04 pmol/l. W trakcie kolejnych wizyt kontrolnych, przy dobrym stanie ogólnym, obserwowano wzrost aktywności transaminaz oraz GGTP. Na podstawie badania USG jamy brzusznej wysunięto podejrzenie stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (*primary sclerosing cholangitis, PSC*), wynik cholangiografii rezonansowej nie był jednak jednoznaczny. Wynik badania anatomopatologicznego, przeprowadzonego po biopsji wątroby, przemawiał za PSC. Włączono leczenie hepatoprotekcyjne i kwas ursodeoksycholowy uzyskując normalizację aktywności transaminaz i GGTP. Obecnie pacjentka czuje się dobrze, otrzymuje sulfasalazynę oraz azatioprynę.

Tak, więc, u tej dziewczynki w chwili badania, tj. 6 miesięcy po zakończeniu sterydoterapii, obniżonej masie kostnej towarzyszyły: zwiększone stężenie OPG i wykrywalne sRANKL, podwyższone parametry stanu zapalnego. Jednocześnie, w oparciu o skalę PCDAI, chorobę określono jako łagodną. Możliwe, że w momencie niniejszego badania obok choroby podstawowej, toczył się inny proces chorobowy, który mógł wpłynąć na badane parametry.

Ważnych informacji dostarcza praca *de Jonga i wsp.* Autorzy nie stwierdzili, aby u ponad 90 dorosłych pacjentów z chorobą Leśniowskiego - Crohna kumulacyjna dawka sterydów była niezależnym czynnikiem predykcyjnym obniżonej BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa czy szyjce kości udowej [237]. Istotny jest fakt, że średnia kumulacyjna dawka sterydów w tym badaniu wynosiła 18,7g. Tak duża ekspozycja na GKS wydaje się być dobrym modelem dla oceny wpływu tych hormonów na BMD.

Należy zaznaczyć, że niekorzystny efekt sterydów widoczny jest szczególnie w obrębie kości beczkowatej, która występuje w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. W badaniu *de Jonga* zmiany osteoporotyczne, natomiast, były wyrażone silniej w szyjce kości udowej, gdzie dominuje kość zbita. Szereg autorów poczyniło podobne obserwacje [197, 240, 247, 248].

Podsumowując wszystkie powyższe spostrzeżenia można stwierdzić, że GKS działają przeciwzapalnie i immunosupresyjnie, a ich niekorzystne oddziaływanie na tkankę kostną jest bardziej wyrażone w kości beleczkowej. Obserwowane zmiany osteoporotyczne kości gąbczastej wydają się raczej odzwierciedlać wpływ przewlekłego procesu zapalnego [148, 158].

Dlatego też uzasadnione jest pytanie: w jaki rzeczywisty sposób glukokortykosterydy wpływają na tkankę kostną? Czy zaburzona mineralizacja kości jest zjawiskiem pierwotnym w przebiegu NZJ, procesie zapalnym o podłożu immunologicznym? Czy też można mówić o procesie wtórnym, związanym ze stosowanymi w terapii lekami hormonalnymi?

Na podstawie własnych obserwacji oraz danych z piśmiennictwa wydaje się, że patomechanizm leżący u podstaw zaburzonej mineralizacji kości w przebiegu NZJ jest niezwykle złożony. Odpowiedzi na te pytania można poszukać w dziedzinie medycyny, jaką jest osteoimmunologia.

Wiadomo, że w złożonej patogenezie NZJ dużą rolę odgrywają procesy immunologiczne. Udokumentowany jest udział cytokin prozapalnych, zwłaszcza TNF- α [249].

Czynnik martwicy guzów alfa (TNF- α) to także jeden z podstawowych czynników aktywujących osteoklasty – stymuluje ich różnicowanie [250], a także działa anty-apoptotycznie [251]. Jednocześnie hamuje różnicowanie i sprzyja apoptozie komórek linii osteoblastycznej [252]. Efektem działania TNF- α jest, więc zmniejszenie procesów kościotworzenia i promocja procesów resorpcji kości.

Mimo takiego działania TNF- α , *Paganelli i wsp.* nie stwierdzili związku między tą cytokiną a BMD [206]. Jednocześnie jednak zaobserwowali, u dzieci z wzjg związek między masą kostną a inną chemokiną prozapalną, jaką jest IL-6. Jak wynika z literatury, również u kobiet po menopauzie, stężenie IL-6 miało znaczenie predykcyjne dla utraty masy kostnej [253].

Kolejną cytokiną prozapalną o uznanej roli w patogenezie NZJ jest IFN- γ . Liczne badania dowodzą udziału również tej cytokiny w metabolizmie kostnym, jakkolwiek wyniki nie są jednoznaczne. Wykazano bowiem, że IFN- γ wpływa na degradację TRAF-6 i w ten sposób, bezpośrednio, hamuje osteoklastogenezę pobudzaną przez RANKL [254]. Z drugiej strony zaś, aktywuje limfocyty T, stanowiące jednocześnie źródło pobudzających osteoklastogenezę: TNF- α i liganda dla RANK [255]. Wydaje się, więc, że interferon gamma w sposób bezpośredni hamuje, a pośredni – stymuluje

osteoklastogenezę. Końcowy efekt działania tej cytokiny zależy prawdopodobnie od innych, współwystępujących czynników, np. nasilenia stanu zapalnego [256].

Wpływ stanu zapalnego i związanych z nim czynników prozapalnych na metabolizm tkanki kostnej potwierdziły obserwacje efektów leczenia przeciwzapalnego.

Wykazano, że leki przeciwzapalne: metotreksat, sulfasalazyna, monoklonalne przeciwciała przeciw TNF- α tj. infliximab (IFX) oraz IL-4 (stosowane w reumatoidalnym zapaleniu stawów) hamują tworzenie osteoklastów z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs – peripheral blood mononuclear cells) [257]. Dzieje się to poprzez modulujący wpływ tych leków na układ OPG-RANKL-RANK. Efektem tego działania jest zwiększenie ekspresji osteoprotegeryny, zmniejszenie ekspresji liganda RANK, a tym samym obniżenie stosunku RANKL : OPG. Dodatkowo, w cytowanym badaniu jedynie infliximab wpływał na ekspresję receptora RANK na komórkach PBMCs [257].

Monoklonalne przeciwciała przeciw TNF- α po raz pierwszy zostało zastosowane w populacji dorosłych w terapii nieswoistych zapaleń jelit w 1992r [258]. W roku 2006 leczenie to zostało zarejestrowane Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej także u dzieci, a w 2007r również w Polsce [259, 260].

Pozytywne wyniki leczenia biologicznego w chorobach jelit, szczególnie w chorobie Leśniowskiego-Crohna, oraz znaczny udział TNF- α w patologii tkanki kostnej, stały się przyczynkiem analizy oceny wpływu IFX na mineralizację kości u dzieci z NZJ w badaniu własnym.

W niniejszej analizie, łącznie 19% pacjentów (2 z wzjg i 6 z ch.L-C) było leczonych infliximabem, zgodnie z obowiązującym protokołem leczniczym [152]. Ze względu na opisywane reakcje anafilaktyczne [261], podaż leku była poprzedzona profilaktyczną infuzją dożylną hydrocortisonu. W tej grupie pacjentów (leczonych biologicznie) średnie stężenie OPG wynosiło 3,63 pmol/l, a u ponad 80% z nich stężenie sRANKL nie było oznaczalne. Tylko u 1 dziecka z tej grupy stwierdzono gęstość mineralną kości poniżej oczekiwanej dla wieku tj. BMD Z-score L1-L4 poniżej -2,0. Powyższe wyniki są zgodne z danymi w piśmiennictwie [262, 263]. Węgierscy badacze obserwowali, że początkowo wyższe stężenie OPG u pacjentów z bardziej aktywną postacią ch.L-C uległo obniżeniu po terapii infliximabem. Towarzyszył temu wzrost stężenia osteokalcyny (OC) i sRANKL [264].

Wydaje się, że początkowo wyższe stężenie OPG może odzwierciedlać mechanizm kompensacyjny dla, związanej z procesem zapalnym, resorpcji kości. Następujące obniżenie stężenia OPG można prawdopodobnie przypisać mniej nasilonemu procesowi zapalnemu – jako efekt przeciwzapalnego działania infliximabu. Cytokiny prozapalne – IL-1 β i TNF- α , zwiększają ekspresję OPG w osteoblastach, natomiast przeciwciało anty TNF- α na tej, pośredniej drodze, będzie zmniejszało syntezę OPG w osteoblastach. Ponadto, jak wiadomo, aktywowane limfocyty T są źródłem RANKL, a tym samym, dzięki aktywności metaloproteinaz – sRANKL. Infliximab modyfikuje aktywność tych enzymów [265], a z kolei OPG wpływa na dysocjację RANKL z powierzchni komórki. Tak, więc, zwiększony poziom sRANKL może wynikać i jednocześnie pośrednio wskazywać na niższe stężenie OPG (mniejsze hamownie oddzielania się RANKL z błony komórkowej). Prawdopodobnie jeden z tych mechanizmów, a może nawet oba, wyjaśniają zwiększenie stężenia sRANKL po leczeniu IFX.

Zagadnienie to wymaga z pewnością dalszych badań.

Znana jest szczególnie rola, jaką RANKL pełni w procesach immunologicznych, a także odpowiedzi Th1- zależnej – odgrywającej, jak wiadomo, istotną rolę w patomechanizmie NZJ, głównie w ch.L-C [266-268].

Udział RANKL w chorobach zapalnych jelit jest, więc, złożony. Obecne w ścianie jelita komórki dendrytyczne (DC – dendritic cell) mają własności komórek prezentujących antygen (APC – antigen presenting cell), a ich dojrzałe formy są źródłem OPG [269, 270]. Ponadto udowodniono, że w błonie śluzowej i podśluzowej jelita u osób z ch.L-C znacznie zwiększa się liczba limfocytów T i B syntetyzujących OPG i RANKL [62, 74]. Aktywacja RANK na komórkach DC, poprzez RANKL, obecny np. na limfocytach T, hamuje szlak apoptozy w komórkach dendrytycznych. Ponadto, związanie czynnika inicjującego apoptozę (TRAIL) przez osteoprotegerynę wzmacnia ten proces. Wydaje się, że okres przeżycia DC może być ważnym czynnikiem w indukcji, tolerancji, promowaniu i w efekcie przewlekaniu się procesu zapalnego w jelicie [270]. Belgijscy badacze oceniali ekspresję TRAIL i jego wpływ na fibroblasty obecne w jelicie (IF – intestine fibroblast) [271]. Ekspresję TRAIL i jego receptorów, zwłaszcza TRAIL-R2 (odpowiedzialnego za apoptozę), stwierdzono między innymi właśnie na IF, głównie w odcinkach jelita z obecnym włóknieniem i przewężeniami. Efekt działania TRAIL był mniejszy w obecności IL-6 i jej receptora, zaś niemal całkowicie odwrócony (tj. brak apoptozy) w obecności OPG. *Aschcroft*, w badaniu na

zwierzętach, wykazał, że po podaniu egzogenego przeciwciała przeciwko osteoprotegerynie (FcOPG), poza poprawą mineralizacji kości, uzyskano zmniejszenie lokalnego stanu zapalnego jelita, promowanego przez limfocyty T [272].

Produkcja cytokin zapalnych przez błonę śluzową jelita jest zapewne ważnym czynnikiem wpływającym na zmniejszenie BMD w przebiegu choroby Leśniowskiego - Crohna. Istnieją dowody, że terapia biologiczna skierowana przeciwko TNF- α wpływa, niezależnie od poprawy klinicznej choroby, także na metabolizm kostny [273-275].

Czy więc u pacjentów z wyjściowo niską BMD, poza konwencjonalnym leczeniem przeciwzapalnym, powinna być rozważona dodatkowo terapia anty TNF- α ? Nasuwa się wobec tego kolejne pytanie: czy każda forma działania przeciwzapalnego wywiera korzystny wpływ na mineralizację kości?

Od ponad 20 lat wiadomo, że dwuletnia terapia sulfasalazyną reumatoidalnego zapalenia stawów zwalnia progresję zmian w kościach [276].

Wszyscy, biorący udział w badaniu własnym pacjenci byli leczeni pochodnymi kwasu 5-aminosalicylowego. Wnioskowanie o wpływie tych leków przeciwzapalnych na układ ocenianych cytokin i BMD w badanej grupie byłoby niewiarygodne, ze względu na to, że preparaty 5-ASA były stosowane w politerapii (z wyjątkiem 2 dzieci).

Analizie poddano również 26 pacjentów leczonych azatiopryną. Co prawda, u większości dzieci z tej grupy stężenie sRANKL w surowicy było oznaczalne, to tylko u 3 – większe niż 0,08 pmol/l. U blisko 70% z tych pacjentów stężenie OPG w surowicy było większe niż 3,61 pmol/l, a 50% z nich miało obniżoną masę kostną (BMD Z-score L1-L4 poniżej -2,0).

W cytowanym wcześniej badaniu *Frei'a* stwierdzono negatywną korelację między BMD a leczeniem azatiopryną [277]. Autorzy nie oceniali dawki azatiopryny, a rozważali jedynie fakt zastosowania jej w terapii. *Frei*, podobnie jak inni badacze, przyjął, że azatioprynę włączano u pacjentów z bardziej aktywną chorobą, a więc przy większym nasileniu stanu zapalnego [241, 277].

Aktualnie uważa się, zgodnie z konsensusem opublikowanym w 2009r, pod auspicjami European Crohn's and Colitis Organisation – ECCO, że azatiopryna powinna być stosowana w terapii podtrzymującej przez wiele lat [278-280].

Istotnym i podnoszonym coraz częściej zagadnieniem jest leczenie żywieniowe nieswoistych zapaleń jelit.

W chwili włączenia do niniejszego badania żadne dziecko z grupy I i II nie było leczone żywieniowo. Prawie 30% chorych, w związku z dość ciężkim przebiegiem choroby, wymagało jednak tego typu terapii w przeszłości (żywienia pozajelitowego lub dojelitowego, przez zgłębnik). Konieczność wdrożenia żywienia pozajelitowego miała miejsce u chorych ze znacznym nasileniem zmian zapalnych w jelitach i u których istniały przeciwwskazania do żywienia drogą przewodu pokarmowego.

Mimo iż niektórzy badacze obserwowali związek między obniżoną BMD u pacjentów z NZJ, a żywieniem dojelitowym przez zgłębnik dożołądkowy (NGT) [198], w pracy własnej nie stwierdzono takiej zależności. Jednakże, u dzieci, u których w przeszłości stosowano żywienie NGT częściej stwierdzano dodatnie wartości stężenia sRANKL. Można przyjąć, że, podobnie jak stwierdzane częściej u chorych dzieci niedożywienie, także stosowanie leczenia żywieniowego w sposób pośredni odzwierciedla rozległość i nasilenie stanu zapalnego w jelitach. Wydaje się, że częściej obserwowane u nich dodatnie wartości stężeń sRANKL mogą stanowić wykładnik procesu zapalnego toczącego się w jelicie. W dalszej części dyskusji kwestia ta będzie jeszcze rozważana.

Kolejną i ostateczną metodą terapeutyczną NZJ jest resekcja jelit. Tę procedurę leczniczą stosuje się przede wszystkim w sytuacjach związanych z lekoopornością i gwałtownym przebiegiem choroby. W materiale własnym u żadnego z dzieci, do chwili badania, nie zastosowano leczenia operacyjnego.

Jak wynika z piśmiennictwa, resekcja jelita jest jednym z czynników ryzyka obniżenia BMD [237, 281], chociaż nie wszyscy autorzy są w tej kwestii zgodni [181, 200, 235]. W związku z resekcją jelita, ale także sterydoterapią, u pacjentów z NZJ może dojść do niedoboru witaminy D3. Każdemu z dzieci uczestniczących w badaniu własnym, w czasie leczenia glukokortykosteroidami suplementowano doustnie witaminę D3 w dawce dziennej równej 400 - 500j. *Cohran* i *wsp.* stwierdzili bardzo rzadkie występowanie niedoboru witaminy D3 w tej grupie chorych [244]. Być może, to nie jej niedobór jest kluczowym czynnikiem w patomechanizmie osteoporozy w przebiegu NZJ. Niemniej, jak podaje *Lehtonen-Veromaa*, hipowitaminoza D3 może być czynnikiem ryzyka nieuzyskania szczytowej masy kostnej, szczególnie w odcinku lędźwiowym i krzyżowym kręgosłupa [282].

Jak wynika z dotychczasowych rozważań, w stanie zapalnym, z jakim mamy do czynienia w NZJ, istnieje kilka potencjalnych źródeł OPG, poza osteoblastami są nim także komórki T oraz komórki ściany jelita [74, 272, 283-285].

Nie jest jednoznaczne, czy podwyższone stężenie tej cytokiny wynika z mechanizmu kompensującego utratę tkanki kostnej, wyraża toczący się w jelicie stan zapalny, czy raczej odzwierciedla pobudzenie układu immunologicznego. W tym ostatnim przypadku, być może, jej oznaczenie mogłoby być kolejnym wartościowym markerem stanu zapalnego [286].

W pracy własnej stężenie OPG i sRANKL nie wykazało korelacji z powszechnie uznanymi wykładnikami stanu zapalnego tj. liczbą krwinek białych, OB czy CRP. W sposób istotnie znamieny natomiast, u dzieci z większą aktywnością choroby (zarówno L-C jak i wzjg) stwierdzono niższe stężenie OPG i wyższe wartości stężenia sRANKL.

Osteoprotegeryna i ligand RANK jako markery stanu zapalnego, przynajmniej na razie, nie wydają się jednak mieć praktycznego zastosowania. Zbyt wiele jest tkanek, będących źródłem tych białek. Zatem przyczyna zwiększonej ilości każdego z nich nie byłaby łatwa do ustalenia. Ponadto koszty oznaczania omawianych cytokin są nadal bardzo wysokie. Niewiele jest wiadomo na temat okresu półtrwania badanych białek oraz ich metabolizmu, co z pewnością dodatkowo utrudniałoby interpretację uzyskanych wyników. Niewątpliwie jednak, jako wczesne markery związane ze stanem zapalnym w zaburzeniach metabolizmu kostnego mają potencjalne szanse zastosowania klinicznego w przyszłości.

Inspiracją do dalszych prac nad omawianymi zagadnieniami jest obserwowana mała częstotliwość oznaczeń sRANKL, zarówno w grupie chorych jak i w grupie kontrolnej dzieci zdrowych. Jedną z prawdopodobnych przyczyn tego zjawiska są, być może, wspomniane trudności metodologiczne.

Niewykrycie formy rozpuszczalnej wynikać może z faktu, że ligand RANK występuje przede wszystkim na powierzchni komórek lub też związany jest z OPG, a rzadko w formie wolnej. Nie jest także ostatecznie ustalone źródło sRANKL w NZJ. Jak przytoczono, poza tkanką kostną, w stanie zapalnym są nim także krążące limfocyty T, a w chorobie jelit – komórki ściany jelita.

Niedożywienie oraz konieczność leczenia żywieniowego w wywiadzie, mogą świadczyć o cięższym przebiegu choroby, a więc bardziej nasilonym procesie zapalnym. W tej właśnie grupie pacjentów stężenie sRANKL było częściej oznaczalne. Jest to kolejny sygnał sugerujący, że wyższe stężenia sRANKL, prawdopodobnie odzwierciedlające większą produkcję tej cytokiny, wiążą się ze wzmożonym stanem zapalnym. Czy źródłem sRANKL u tych pacjentów są głównie komórki ściany jelita w

odcinkach objętych procesem zapalnym? Być może wyjaśnienie tych zagadnień pozwoli w przyszłości prognozować dalszy przebieg choroby lub ukierunkować terapię.

W badanej grupie chorych obserwowano tendencję do wyższych stężeń OPG w surowicy niż w grupie kontrolnej. Wartości te były ponadto proporcjonalne do aktywności choroby, tj. wyższe w umiarkowanej postaci wzjg i aktywnej ch.L-C w porównaniu do osób z łagodną i nieaktywną postacią choroby. Jak wiadomo, osteoprotegeryna jest wydzielana w większych ilościach w celu ochrony tkanki kostnej przed jej degradacją, kompensując wzmożoną produkcję / aktywność RANKL. Wydaje się, że wyższe stężenie OPG może być wynikiem wzmożonej produkcji tego białka, mającej na celu związanie sRANKL (w odpowiedzi na wzmożoną produkcję liganda RANK?), a tym samym ochronę tkanki kostnej.

Zwiększenie stężenia krążącej OPG może jednak nie być związane z procesem dotyczącym tkanki kostnej, ale wynikać z zaangażowaniem tego białka w inny patomechanizm, np. toczący się stan zapalny. Wyjaśniałoby to jednoczesne zwiększenie stężenia zarówno OPG jak i sRANKL w przeprowadzonych badaniach. Wydaje się, że może to być także proces toczący się miejscowo w jelicie, gdzie OPG wiąże TRAIL, mimo iż powinowactwo do czynnika proapoptycznego jest mniejsze niż do liganda RANK. Związanie TRAIL hamuje apoptozę, między innymi, komórek dendrytycznych. W przebiegu przewlekłego stanu zapalnego w jelicie, taka koncepcja wydaje się częściowo uzasadniona. Stwierdzenie w pracy własnej wyższego stężenia OPG u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, w której, w porównaniu do wzjg, proces zapalny jest bardziej rozległy i nasilony, upoważnia do tych przypuszczeń.

Jeżeli jednak nasilona synteza OPG nie kompensuje wzmożonej produkcji sRANKL, to nawet zwiększonemu stężeniu osteoprotegeryny towarzyszyć będzie zwiększone stężenie wolnej i aktywnej metabolicznie frakcji liganda RANK. Być może właśnie taka sekwencja zdarzeń tłumaczy wyniki przeprowadzonych oznaczeń u badanych chorych dzieci z NZJ. W ten sposób można by wyjaśnić obserwowane w analizie własnej zaburzenia mineralizacji kości u chorych, a także częstsze oznaczalne stężenie sRANKL i utrzymujący się proces zapalny w jelicie.

Należy zwrócić uwagę na jeszcze jeden fakt. Otóż w badaniu własnym stwierdzono częstsze występowanie dodatnich wartości sRANKL u chorych chłopców, u których stwierdzono niższą masę kostną częściej niż u dziewczynek. Także ta

obserwacja jest zgodna z założeniem, że zwiększone stężenie sRANKL towarzyszy procesom niszczenia kości.

Należy zastanowić się, czy stwierdzenie u pacjenta mierzalnego / zwiększonego stężenia sRANKL w surowicy jest czynnikiem predykcyjnym ryzyka zaburzenia procesu mineralizacji kości. Wówczas wzmożone działania prewencyjne miałyby istotne znaczenie dla tej grupy chorych dzieci.

Z drugiej zaś strony, sRANKL było częściej oznaczalne u dzieci niedożywionych, u chorych leczonych żywieniowo i tych, które były zakwalifikowane do leczenia biologicznego (anty TNF- α). Przyjmując wymienione fakty za pośrednie wykładniki aktywności choroby i toczącego się zapalenia, wyniki te przemawiają za koncepcją, w której sRANKL odzwierciedla aktywność procesu zapalnego. Z pewnością ten problem wymaga dalszych badań.

Kolejnym zagadnieniem, analizowanym w pracy własnej, jest ocena związku między stosowanym leczeniem glukokortykosterydami, a stężeniami osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B oraz gęstością mineralną kości u badanych dzieci. Zastanawiające jest, że to właśnie chorzy leczeni glukokortykosterydami mieli wyższe stężenie OPG niż dzieci zdrowe. Udokumentowany jest wszakże negatywny wpływ sterydów na syntezę OPG, a pozytywny na produkcję sRANKL [124, 125, 227]. Nie można jednak pominąć faktu, że sterydy mają własności przeciwzapalne. Hamują one produkcję mediatorów zapalnych, a tym samym przeciwdziałają negatywnemu ich (tzn. czynników zapalnych) wpływowi na tkankę kostną. Przyjmując, że sterydy w pierwszym rzędzie działają przeciwzapalnie, należałoby jednak spodziewać się pozytywnego efektu ich działania na tkankę kostną. Prawdopodobnie, zależnie od genetycznie uwarunkowanej wrażliwości tkanki kostnej na sterydy i indywidualnej odpowiedzi organizmu na leczenie, BMD leczonych osób może w trakcie sterydoterapii zachować się odmiennie: wzrosnąć, obniżyć się lub nie zmienić [196]. Ponadto, odmienny jest wpływ toczącego się procesu zapalnego i sterydów na obrót kostny. Proces zapalny zmniejsza obrót kostny, hormony natomiast działają przeciwnie. Nie można wykluczyć, że dochodzi do ustalenia się swoistej równowagi w zakresie obrotu kostnego i w efekcie ustabilizowania tempa modelacji tkanki kostnej.

Specyfika populacji dziecięcej, obok dynamicznych zmian i procesów – głównie anabolicznych, zachodzących w poszczególnych okresach życia dziecka, polega na krótszym czasie trwania chorób przewlekłych (wynika to z wieku chorych), z krótszym

czasem ich leczenia w porównaniu do populacji dorosłych, w szczególności - mniejszej całkowitej dawki sterydów. Prawdopodobnie tłumaczy to słabiej niż u dorosłych wyrażony niekorzystny efekt długotrwałego działania GKS na tkankę kostną.

Jak wspomniano wcześniej limfocyty T są nie tylko komórkami zaangażowanymi w proces zapalny, ale także oddziałują na metabolizm tkanki kostnej, poprzez układ RANKL-RANK. Ingerencja w te interakcje, podobnie jak niekontrolowana czy przewlekła aktywność samych limfocytów T, może prowadzić do różnego rodzaju patologii. Wydaje się, że właśnie taki mechanizm może mieć miejsce w NZJ przebiegających z zaburzeniami mineralizacji kości. Nasuwa się kolejne pytanie: czy, w takim razie, oznaczanie osteoprotegeryny i liganda dla RANK może być zastosowane w procesie diagnostyczno – terapeutycznym u chorych na nieswoiste zapalenie jelit?

Wartym podkreślenia jest fakt bardzo szybkiego efektu, jaki uzyskiwany jest po iniekcji rekombinowanej OPG lub RANKL na resorpcję kości i regulację liczby czynnych osteoklastów, czego dowiedziono już na etapie I fazy badań klinicznych [138, 139]. Ligand RANK stymuluje resorpcję kości w ciągu godziny od podania, zaś 2 godziny od iniekcji OPG – resorpcja zostaje zahamowana. To szybkie i wyraźne zmniejszenie liczby osteoklastów w odpowiedzi na podaną OPG jest wyjątkowe w porównaniu z innymi, znanymi czynnikami antyresorpcyjnymi. Istnieją albowiem doniesienia poddające w wątpliwość efektywność bifosfonianów, powszechnie stosowanych w terapii osteoporozy [287].

Niewątpliwie, zahamowanie syntezy i wydzielania RANKL wpływa ochronnie na tkankę kostną. Czy jednak ingerencja w układ OPG-RANKL, mająca na celu zwiększenie relacji stężeń tych białek na korzyść osteoprotekcyjnej OPG, nie będzie miała innych, negatywnych konsekwencji? Osteoprotegeryna, obok liganda - RANK wiąże przecież również zależny od TNF czynnik apoptotyczny (TRAIL). Zablokowanie aktywności TRAIL sprzyja niekontrolowanej aktywności i podziałom komórek, co może w konsekwencji doprowadzić do nowotworzenia oraz rozwoju procesów o charakterze autoagresji.

Związek wzjg z rozwojem raka jelita grubego jest znany. Nieswoiste zapalenia jelit należą do chorób o podłożu autoimmunologicznym. Wystąpienie jednej patologii z tej grupy schorzeń zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia innego procesu autoagresywnego. Ilustruje to opisany przypadek dziewczynki biorącej udział w

niniejszym badaniu, u której nadal nie można definitywnie wykluczyć równoległe toczącego się stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (PSC).

Nierozważna ingerencja w układ OPG - RANKL - RANK jest, więc, ryzykowna, a dalsze badania na tym polu są konieczne.

Stosowane obecnie leczenie biologiczne nieswoistych zapaleń jelit infliximabem, na podstawie aktualnych danych z piśmiennictwa, wydaje się skuteczne i bezpieczne, z częstością występowania działań niepożądanych porównywalna do innych metod leczenia [261, 288, 289]. Jednak już wiadomo, że w ciągu 12 miesięcy od zaprzestania terapii podtrzymującej u ok. 75% leczonych dochodzi do nawrotu choroby, przeważnie po trzech miesiącach [290, 291].

Skoro kliniczna remisja ściśle związana jest z okresem podawania IFX, kolejne pytanie brzmi: jak długo stosować takie leczenie? Chociaż terapia ta jest uznawana za bezpieczną, niemniej trzeba wziąć pod uwagę ryzyko rozwoju procesów nowotworowych. Powikłania natomiast, wynikają przede wszystkim z immunizacji i wytworzenia przeciwciał przeciwko infliximabowi. Analogicznie, podobnych konsekwencji można się spodziewać przy terapii anty - RANKL, chociaż na razie badania nad denosumabem są niezwykle obiecujące [141, 143, 292].

W posumowaniu należy zaznaczyć, że grupa badana była zróżnicowana – nie tylko ze względu na jednostkę chorobową – choroba Leśniowskiego Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego, ale także na okres trwania choroby, stopień jej zaawansowania i różny etap leczenia w chwili dokonywania oceny.

Interpretacja uzyskanych w pracy własnej wyników nie upoważnia do wyciągania daleko idących wniosków, ale stanowi kolejny głos w trwającej dyskusji nad poszerzeniem diagnostyki i nowymi formami leczenia. Być może przyczyni się do rozszerzenia wiedzy dotyczącej oceny procesów mineralizacji kości u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit, a ponadto stawia przed badaczami wyzwania do dalszych prac nad etiopatogenezą, diagnostyką i terapią w tej grupie chorych.

WNIOSKI:

1. Zaburzenia mineralizacji kości, o różnorodnym patomechanizmie, występują stosunkowo często u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit.
2. Ocena stężenia osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy krwi u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit może służyć jako jeden z parametrów oceny aktywności choroby.
3. Stężenie osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy krwi może mieć związek z występowaniem zaburzeń mineralizacji kości u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit. Wydaje się jednak, że cytokiny te nie mogą służyć w diagnostyce różnicowej między wrzodziejącym zapaleniem jelit a chorobą Leśniowskiego – Crohna.
4. Stężenie osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w surowicy krwi słabo koreluje z powszechnie uznanymi wskaźnikami stanu zapalnego.
5. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono wartości referencyjne dla stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi w populacji pediatrycznej. Wyższe wartości stwierdzono u chłopców niż u dziewcząt. Nie obserwowano zależności od wieku dzieci.
6. Ingerencja w równowagę układu cytokin: osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kapa B może w przyszłości stanowić potencjalną metodę terapeutyczną nieswoistych zapaleń jelit z współwystępującymi zaburzeniami mineralizacji tkanki kostnej. Problem ten wymaga jednak dalszych badań.

7. ANEKS

Załącznik 1.

Gdańsk dnia.....

Zgoda poinformowanego pacjenta

Zgadzam się na pobranie krwi (3ml) u mojego dziecka

.....
.....ur.....zam.....
.....

w trakcie wykonywania badań kontrolnych.

Zostałam/em poinformowany o celu wykonywanych badań o charakterze naukowym.

Celem badań jest ocena stężenia osteoprotegeryny i liganda receptora NF-kappa B w wybranych chorobach u dzieci. Wyniki badań mogą wnieść informacje dotyczące istoty zaburzeń metabolizmu kostnego i być może przyczynia się do opracowania nowych metod leczenia.

Badania będą przeprowadzone w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku, zgodnie z ustalonymi szczegółowymi standardami postępowania. Wyniki opracowane będą zgodnie z ustawą o przetwarzaniu danych osobowych.

Podpis rodziców

Podpis badacza

Gdańsk, dnia

Zgoda poinformowanego przedstawiciela grupy kontrolnej

Zgadzam się na pobranie krwi (3ml) u mojego dziecka

.....
.....ur.....zam.....
.....

w trakcie wykonywania badań kontrolnych.

Zostałam/em poinformowany o celu wykonywanych badań o charakterze naukowym. Celem badań jest ocena stężenia osteoprotegeryny i liganda receptora NF-kappa B w wybranych chorobach u dzieci. Wyniki badań mogą wnieść informacje dotyczące istoty zaburzeń metabolizmu kostnego i być może przyczynia się do opracowania nowych metod leczenia. Aby ocenić wyniki konieczne jest również wykonanie badań u dzieci zdrowych, a następnie porównanie ich z wynikami grupy dzieci chorych.

Badania będą przeprowadzone w Katedrze Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku, zgodnie z ustalonymi szczegółowymi standardami postępowania. Wyniki opracowane będą zgodnie z ustawą o przetwarzaniu danych osobowych.

Podpis rodziców

Podpis badacza

Załącznik 2.

INFORMACJA O BADANIU ORAZ ŚWIADOMA ZGODA BADANEGO

Pełna nazwa programu badawczego: Stężenie osteoprotegeryny i liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci.

Nazwisko i imię

chorego.....

Data

urodzenia.....Wiek.....Płeć.....

Adres.....

.....

Telefon.....

.....

1. Założenia badania.

Osteoprotegeryna (OPG) oraz ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B (RANKL) są białkami biorącymi udział w przebudowie kości. Zaburzenia mineralizacji kości są częstym problemem współtowarzyszącym wielu chorobom – zarówno w związku z samym procesem chorobowym jak i stosowaną terapią. Od wielu lat prowadzone są badania dotyczące udziału wymienionych białek w zaburzeniach mineralizacji kości. Niewiele badań dotyczy jednak populacji dziecięcej. Celem tego badania jest ocena stężenia OPG oraz RANKL w odniesieniu do ocenionej gęstości kości metodą densytometrii.

Niniejsze badanie zostało przyjęte i zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw badań naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku, powołaną przez Rektora Uczelni, na podstawie rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej. Zadaniem Komisji jest ochrona praw badanego. Kierownikiem badania jest pani dr hab. n. med. Barbara Kamińska

2. Postępowanie badawcze.

Badanie będzie prowadzone w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Pracowni Diagnostyki Osteoporozy Fundacji Budowy i Rozwoju Ośrodka Reumatologicznego Centrum Reumatologii i Osteoporozy w Gdyni. W czasie kontrolnej wizyty w Klinice

przeprowadzone będą: badanie fizykalne, pobrana próbka krwi (3ml) oraz wykonana densytometria kręgosłupa lędźwiowego aparatem LUNAR w zakresie kręgow L1-L4.

3. Ryzyko związane z badaniem.

Próbkę krwi pobierzemy w objętości 3 ml w trakcie wizyty lekarskiej. Pobieranie krwi wiąże się z pewnymi niedogodnościami- ukłucie, swędzenie, wyjątkowo -niewielki wylew podskórny.

Densytometria jest bezpieczną metodą badania mineralizacji kości w oparciu o metodę absorpcyjometrii dwufotonowej. Nie wiąże się z ryzykiem.

4. Korzyści związane z badaniem.

Badanie ma charakter poznawczy. Jego wynik może przyczynić się do wdrożenia nowych metod terapeutycznych leczenia zaburzeń mineralizacji kości w wybranych chorobach autoimmunologicznych w przyszłości.

5. Poufność wyników badania.

Zachowamy pełną poufność dotyczącą osobiście Pana/Pani dziecka oraz wyników badań. Wyniki zostaną przedstawione w *publikacjach naukowych/ pracy doktorskiej Agnieszki Jankowskiej* bez ujawnienia danych osobowych - nazwisko, imię, adres itd.

6. Opłaty.

Za uczestnictwo w badaniu nie przewidujemy opłaty ani wynagrodzenia żadnej ze stron.

7. Jak uzyskać dodatkowe informacje.

Zachęcamy Pana/Panią do zadawania pytań, które dotyczą badania, przed i w czasie jego przebiegu. Otrzyma Pan/Pani także kopię niniejszego pisma do wglądu. Jeśli Pan/Pani będzie miał dodatkowe pytania prosimy dzwonić na numer 606335246.

8. Uczestnictwo.

Może Pan/Pani w każdej chwili zrezygnować z uczestnictwa w tym badaniu, po zawiadomieniu lekarza Agnieszki Jankowskiej albo Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci AMG.

9. Podpisy.

Przeczytałem i zapoznałem się z wyżej podaną informacją oraz możliwością uzyskania dodatkowych informacji, w każdej chwili. Zgadzam się uczestniczyć w badaniu. Otrzymałem jedną kopię niniejszego pisma.

Podpis.....(*badanego*).....Data.....

Podpis.....(*rodziców lub prawnego opiekuna*).....Data.....

Ja, niżej podpisany w pełni wyjaśniłem wszelkie szczegóły tego badania choremu lub prawnemu opiekunowi. W pełni świadomie podejmuję się prowadzenia tego badania i rozumiem swoją rolę.

Podpis(*badacza*).....Nazwisko i imię
drukowane.....Data.....

Podpis.....(*świadka*).....Nazwisko i imię drukowane.....Data

Adres i telefon świadka.....

STERSZCZENIE

Osteoprotegeryna, ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B i receptor aktywujący czynnik jądrowy kappa B stanowią układ cytokin odgrywających kluczową rolę w procesach tworzenia i resorpcji tkanki kostnej.

Osteoprotegeryna jest białkiem należącym do nadrodziny receptorów dla czynnika martwicy guzów, o masie cząsteczkowej 55 kDa, produkowanym przez komórki wielu tkanek. Pełniąc funkcję rozpuszczalnego receptora, osteoprotegeryna wiąże ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B i tym samym zapobiega reakcji tego ostatniego z receptorem obecnym na powierzchni komórek. W efekcie nie dochodzi, między innymi, do różnicowania i dojrzewania komórek linii osteoklastów, a więc zahamowany zostaje proces resorpcji kości.

Poza udziałem w metabolizmie tkanki kostnej, osteoprotegeryna oraz jej ligand odgrywają, nie do końca poznana, rolę w układzie immunologicznym.

Nieswoiste zapalenia jelit to grupa przewlekłych chorób zapalnych, obejmująca wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz chorobę Leśniowskiego – Crohna. Etiopatogeneza tych chorób pozostaje wciąż nie w pełni wyjaśniona, niewątpliwy jest jednak udział procesów autoimmunologicznych. W obrazie klinicznym, obok zajęcia układu pokarmowego, występują także objawy dotyczące innych narządów i układu, w tym zaburzenia mineralizacji kości.

Celem pracy było oznaczenie stężeń: osteoprotegeryny, liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B, pomiar gęstości mineralnej kości u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit oraz ocena związku między badanymi parametrami w badanej grupie pacjentów. Dodatkowym celem była próba ustalenia wartości referencyjnych dla stężeń omawianych cytokin w surowicy krwi dzieci zdrowych.

Badaniem objęto 91 dzieci leczonych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wśród nich, u 18 dzieci rozpoznano wrzodziejące zapalenie jelita grubego, u 24 dzieci chorobę Leśniowskiego – Crohna, a 51 dzieci stanowiło grupę kontrolną.

Oznaczenia badanych białek u wszystkich dzieci wykonano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu testów komercyjnych firmy Biomedica (BI-20402, BI-20422H). Dodatkowo, u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit oceniono

gęstość mineralną kości metodą techniką absorpcjometrii podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego.

Stężenie osteoprotegeryny w grupie dzieci chorych mieściło się w granicach 0,20 – 7,3 pmol/l SD: 1,35, średnio 4,09 pmol/l, mediana 4,10 pmol/l i było wyższe niż u dzieci z grupy kontrolnej (odpowiednio: 0,03-10,2 pmol/l SD: 1,72, średnio: 3,91 mediana 3,61 pmol/l), jednak różnica nie osiągnęła statystycznej istotności.

Jedynie u 21% wszystkich badanych dzieci udało się oznaczyć stężenia liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B. Znamienne częściej stężenia były mieralne u dzieci chorych na nieswoiste zapalenia jelit ($p=0,001$), także średnia z wyznaczonych wartości była znamienne wyższa w grupie dzieci chorych w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej ($p<0,02$).

U blisko 29% dzieci chorych stwierdzono niższą gęstość mineralną kości niż oczekiwana dla wieku, częściej u chorych chłopców niż chorych dziewczynek ($p<0,036$).

Stwierdzono związek między występowaniem niższych wartości stężenia osteoprotegeryny, a bardziej aktywnym procesem chorobowym. Niższe wartości stężenia liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B występowały znamienne częściej u dzieci z obniżeniem masy kostnej.

Za wartość referencyjną dla stężenia osteoprotegeryny przyjęto wartość 3,61 pmol/l. W związku z małą częstością występowania mierzalnych stężeń liganda, nie udało się wyznaczyć wartości referencyjnej dla stężenia tego białka.

Oznaczanie badanych cytokin być może znajdzie zastosowanie w diagnostyce nieswoistych zapaleń jelit ze współwystępującymi zaburzeniami mineralizacji kości. Omawiane białka stanowią potencjalny punkt uchwytu dla nowych metod terapeutycznych tych chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408 (6812): 535-6.
2. Kiss MHB. Osteoporoze. *Endocrinologia Pediátrica: Aspectos Físicos e Metabólicos do Recém Nascido ao Adolescente*. 2a Ed. 2002: 354-62.
3. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Osteoporosis in children and adolescents: Diagnosis, risk factors, and prevention. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2001;14(7):833-59.
4. 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.
5. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *Southern Medical Journal* 2001;94(6) : 569-73.
6. Fast Facts on Osteoporosis. źródło:
<http://www.nof.org/osteoporosis/diseasefacts.htm>
7. Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General 2004.
źródło: http://www.surgeongeneral.gov/library/bonehealth/docs/full_report.pdf
8. Król-Kończewska E. Nowa dekada. *Przew Lek* 2000;4:114-5.
9. Źródło: III Środkowo Europejski Kongres Osteoporozy i Osteoartrozy XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii i Polskiej Fundacji Osteoporozy Kraków, 24-26 września 2009 <http://www.osteoporoza.pl>.
10. Czerwiński E. Zaburzenia Metabolizmu Tkanki Kostnej, In: Szmidt J, Gruca Z, Krawczyk M et al, editors. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2004. p. 77-82.
11. Czerwinski E, Osieleniec J, Badurski J et al. Współczesna diagnostyka osteoporozy. *Family Medicine & Primary Care* 2008:821-9.
12. Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *Journal of Cell Science* 1995;108(8):2729-32.
13. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: The bone modeling problem. *Anatomical Record* 1990;226(4):403-13.
14. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: The remodeling problem. *Anatomical Record* 1990;226(4):414-22.

15. Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin: A novel local player in bone metabolism. *European Journal of Endocrinology* 1997;137(4):345-6.
16. Geusens P, Dequeker J, Verstraeten A et al. Age-, sex-, and menopause-related changes of vertebral and peripheral bone: Population study using dual and single photon absorptiometry and radiogrammetry. *Journal of Nuclear Medicine* 1986;27(10):1540-9.
17. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B et al. Peak bone mass. *Osteoporosis International* 2000;11(12):985-1009.
18. Suda T, Takahashi N, Udagawa N et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* 1999;20(3):345-57.
19. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988;123(5):2600-2.
20. Liu B-, Guo J, Lanske B et al. Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139(4):1952-64.
21. Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y et al. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 1999;140(2):1005-8.
22. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(7):3597-602.
23. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142(12):5050-5.
24. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29(2):155-92.
25. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-19.
26. Yasuda H. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF). *Seikagaku* 1998;70(5):386,390.
27. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of Immunology* 1998;161(11):6113-21.

28. Kwon BS, Wang S, Udagawa N et al. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB Journal* 1998;12(10):845-54.
29. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S- et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;234(1):137-42.
30. Wong BR, Rho J, Arron J et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(40):25190-4.
31. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139(3):1329-37.
32. Rogers A, Eastell R. Review: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: Clinical utility in metabolic bone disease assessment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90(11):6323-31.
33. Emery JG, McDonnell P, Burke MB et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(23):14363-7.
34. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(7):3597-602.
35. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology* 2002;20:795-823.
36. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE et al. Osteoprotegerin serum levels in men: Correlation with age, estrogen, and testosterone status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001;86(7):3162-5.
37. Khosla S, Arrighi HM, Melton III LJ et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporosis International* 2002;13(5):394-9.
38. Rogers A, Saleh G, Hannon RA et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;87(10):4470-5.
39. Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporosis International* 2005;16(4):417-23.
40. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32(6):681-6.

41. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390(6656):175-9.
42. Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *Journal of Leukocyte Biology* 1999;65(6):715-24.
43. Lacey DL, Tan HL, Lu J et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *American Journal of Pathology* 2000;157(2):435-48.
44. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M et al. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142(4):1419-26.
45. Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;314(4):1021-7.
46. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;275(3):768-75.
47. Jones DH, Kong Y-, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002;61(SUPPL. 2):ii32-9.
48. Hofbauer LC, Zeitz U, Schoppet M et al. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis Rheum* 2009;60(5):1427-37.
49. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Journal of the American Medical Association* 2004;292(4):490-5.
50. Kong Y-, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397(6717):315-23.
51. Wong BR, Josien R, Lee SY et al. TRANCE (Tumor necrosis factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in t cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186(12):2075-80.
52. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C et al. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis and Rheumatism* 2004;50(7):2309-16.
53. Lam J, Nelson CA, Ross FP et al. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *Journal of Clinical Investigation* 2001;108(7):971-9.

54. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- κ B ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(50):41155-64.
55. Iwamoto K, Miyamoto T, Sawatani Y et al. Dimer formation of receptor activator of nuclear factor κ B induces incomplete osteoclast formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;325(1):229-34.
56. Kim N, Odgren PR, Kim D- et al. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(20):10905-10.
57. Tat SK, Padrines M, Theoleyre S et al. OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone* 2006;39(4):706-15.
58. Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y et al. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF- κ B ligand derived from osteoblasts. *Journal of Immunology* 2007;178(1):192-200.
59. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G et al. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology International* 2005;26(1):63-9.
60. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NF κ B ligand and tumor necrosis factor- α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002;30(2):340-6.
61. Targońska M, Kochanowska I, Ostrowski K et al. Osteoimmunology: New area of research on the associations between the immune and bone systems. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2001;105(5):435-40.
62. Moschen AR, Kaser A, Enrich B et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel diseases and relates to the state of bone loss. *Gut* 2005;54(4):479-87.
63. Mori K, Le Goff B, Berreur M et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 2007;211(5):555-62.
64. Lipton A, Ali SM, Leitzel K et al. Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2002;8(7):2306-10.
65. Jono S, Ikari Y, Shioi A et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106(10):1192-4.
66. Omland T, Drazner MH, Ueland T et al. plasma osteoprotegerin levels in the general population: Relation to indices of left ventricular structure and function. *Hypertension* 2007;49(6):1392-8.

67. Masi L, Simonini G, Piscitelli E et al. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol* 2004;31(5):986-91.
68. Rouster-Stevens KA, Klein-Gitelman MS. Bone health in pediatric rheumatic disease. *Curr Opin Pediatr* 2005;17(6):703-8.
69. Varsani H, Patel A, van Kooyk Y et al. Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF-kappaB (RANK). *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(4):583-90.
70. Ziółkowska H, Roszkowska-Blaim M. Osteoprotegerin and calcium-phosphorus metabolism parameters in children with chronic renal failure. *Przegl Lek* 2006;63 Suppl 3:68-71.
71. Galluzzi F, Stagi S, Salti R et al. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol* 2005;153(6):879-85.
72. Granchi D, Garaventa A, Amato I et al. Plasma levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in patients with neuroblastoma. *Int J Cancer* 2006;119(1):146-51.
73. Simonini G, Masi L, Giani T et al. Osteoprotegerin serum levels in Kawasaki disease: an additional potential marker in predicting children with coronary artery involvement. *J Rheumatol* 2005;32(11):2233-8.
74. Franchimont N, Reenaers C, Lambert C et al. Increased expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clinical and Experimental Immunology* 2004;138(3):491-8.
75. Tanaka S, Nakamura I, Inoue J- et al. Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2003;21(3):123-33.
76. Mamula P, Telega GW, Markowitz JE et al. Inflammatory bowel disease in children 5 years of age and younger. *American Journal of Gastroenterology* 2002;97(8):2005-10.
77. Ruemmele FM, El Khoury MG, Talbotec C et al. Characteristics of inflammatory bowel disease with onset during the first year of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2006;43(5):603-9.
78. Lee C-, Changchien C-, Chen P- et al. Eosinophilic gastroenteritis: 10 Years experience. *Am J Gastroenterol* 1993;88(1):70-4.
79. Landowski P. Atypowe postaci przewlekłego nieswoistego zapalenia jelita grubego. w: *Choroby jelita grubego u dzieci*. red: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A. Wydawnictwo Adam Marszałek; 2004. p. 65-77.

80. Macafee DAL, Abercrombie JF, Maxwell-Armstrong C. Pouchitis. *Colorectal Disease* 2004;6(3):142-52.
81. Sakane T, Takeno M, Suzuki N et al. Behcet's disease. *N Engl J Med* 1999;341(17):1284-91.
82. Keighley MRB, Shouler P. Clinical and manometric features of the solitary rectal ulcer syndrome. *Dis Colon Rectum* 1984;27(8):507-12.
83. Büller HA. Problems in diagnosis of IBD in children. *Netherlands Journal of Medicine* 1997;50(2):S8-S11.
84. Czaja-Bulsa G, Kurzawska-Piszczek A, Bulsa M. Inflammatory bowel disease in children from West Pomeranian region. *Family Medicine and Primary Care Review* 2006;8(3):578-81.
85. Cosgrove M, Al-Atia RF, Jenkins HR. The epidemiology of paediatric inflammatory bowel disease. *Archives of Disease in Childhood* 1996;74(3 SUPPL.):460-1.
86. Bartnik W. Inflammatory bowel disease. *Journal Physiol Pharmacol* 2003;54:205-10.
87. Blumberg RS SW. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001;285:643-7.
88. Ryzko J. Nieswoiste zapalenia jelit u dzieci. *Przeegl Ped* 1999;29:288-95.
89. Radwan P. Etiopatogeneza nieswoistych zapaleń jelit. *Med Sci Rev* 2000;1:41-6.
90. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115(1):182-205.
91. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: Immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001;120(3):622-35.
92. Kmieć Z, Kartanowicz D, Wierzbicki P. Rola odpowiedzi immunologicznej w patogenezie chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004;6:417-22.
93. Balish E, Warner T. *Enterococcus faecalis* Induces Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Knockout Mice. *Am J Pathol* 2002;160:2253-7.
94. Kamińska B, Landowski P, Korzon M et al. Zależność pomiędzy składem beztlenowej flory bakteryjnej jelita grubego a stopniem aktywności nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2003;5:113-6.
95. Kamińska B. Nieswoiste Zapalenia Jelit u Dzieci: Etiologia i Patogeneza. w: *Choroby jelita grubego u dzieci*. red: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A. Toruń: Adam Marszałek; 2004. p. 39-47.

96. Kamińska B, Landowski P, Korzon M et al. Potential role of sulphate-reducing bacteria in etiopathogenesis of inflammatory bowel disease in children: preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;Suppl. 1(39):31.
97. Reif S. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760). *Gut* 1997;40:754-60.
98. Ryzko J, Bartnik W, Socha P. Odrębności kliniczne nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Pol* 2003;78:355-61.
99. Grzybowska K. Clinical symptoms of non-specific inflammatory bowel disease in children. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004;6(2):185-7.
100. Adamska I, Mierzwa G, Szaflarska-Popławska A. Analiza wybranych parametrów krzepnięcia krwi u dzieci i młodzieży chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004;6:279-83.
101. Budzyńska A. Znaczenie endoskopii w diagnostyce i postępowaniu terapeutycznym u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Gastroenterol Polska* 2006;13:393-8.
102. Ryzko J. Obraz kliniczny i farmakoterapia nieswoistych zapaleń jelit u dzieci. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004;6(4.):449-53.
103. Kamińska B. Objawy i Przebieg Kliniczny Najczęstszych Postaci Nieswoistych Zapaleń Jelit u Dzieci. w: *Choroby jelita grubego u dzieci*. red: Korzon M, Kamińska B, Szarszewski A. Toruń: Adam Marszałek; 2004.
104. Ryzko J, Woynarowski M. Ocena przebiegu nieswoistych zapaleń jelit u dzieci według systemu punktowego. *Pediatr Pol* 1995;70:569.
105. Ryzko J, Woynarowski M. Zastosowanie skali punktowej w ocenie aktywności choroby Leśniowskiego - Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u dzieci. *Pediatrics Pol* 1995;70:585-9.
106. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S et al. Etanercept for active Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001;121(5):1088-94.
107. Rutgeerts P, Lemmens L, Van Assche G et al. Treatment of active Crohn's disease with onercept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): Results of a randomized, open-label, pilot study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2003;17(2):185-92.
108. Dziki A. Nieswoiste Przewlekłe Zapalenie Jelit. w: *Zapalenie. Patofizjologia i klinika*. red .Tchórzewski H. Medpress; 1998. p. 217-31.
109. Dziki A, Trzciński R, Sygut A. Rola i miejsce leczenia chirurgicznego w nieswoistych przewlekłych zapaleniach jelit. *Pediatr Współ Gastroenterol Hepatol Żyw Dziecka* 2004;6(4):455-9.

110. Loftus Jr. EV. Epidemiology and Risk Factors for Colorectal Dysplasia and Cancer in Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35(3):517-31.
111. Jess T, Gamborg M, Matzen P et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100(12):2724-9.
112. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2006;23(8):1097-104.
113. Pigot F, Roux C, Chaussade S et al. Low bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1992;37(9):1396-403.
114. Burnham JM, Shults J, Semeao E et al. Whole body BMC in pediatric Crohn disease: Independent effects of altered growth, maturation, and body composition. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004;19(12):1961-8.
115. Semeao EJ, Jawad AF, Zemel BS et al. Bone mineral density in children and young adults with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999;5(3):161-6.
116. Gupta A, Paski S, Issenman R et al. Lumbar spine bone mineral density at diagnosis and during follow-up in children with IBD. *Journal of Clinical Densitometry* 2004;7(3):290-5.
117. Herzog D, Bishop N, Glorieux F et al. Interpretation of bone mineral density values in pediatric Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1998;4(4):261-7.
118. Gokhale R, Favus MJ, Karrison T et al. Bone mineral density assessment in children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;114(5):902-11.
119. Cowan FJ, Warner JT, Dunstan FDJ et al. Inflammatory bowel disease and predisposition to osteopenia. *Archives of Disease in Childhood* 1997;76(4):325-9.
120. Issenman RM. Bone mineral metabolism in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999;5(3):192-9.
121. Bischoff SC, Herrmann A, Göke M et al. Altered bone metabolism in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* 1997;92(7):1157-63.
122. Ghosh S, Cowen S, Hannan WJ et al. Low bone mineral density in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis, at diagnosis. *Gastroenterology* 1994;107(4):1031-9.
123. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics* 2002;96(1):23-43.

124. Vidal NOA, Brändström H, Jonsson KB et al. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: Down-regulation by glucocorticoids. *Journal of Endocrinology* 1998;159(1):191-5.
125. Humphrey EL, Williams JHH, Davie MWJ et al. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone* 2006;38(5):652-61.
126. Compston JE. Osteoporosis, corticosteroids and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1995;9(3):237-50.
127. Kanis JA, Oden A, Johnell O et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporosis International* 2007;18(8):1033-46.
128. Reguły Interpretowania Badań DXA. w: Densytometria kości. Materiały Kursu Certyfikacyjnego dla lekarzy. red. Lorenc RS, Olszyński WP, Karczmarewicz E. ISCD; 2006. p. 117-31.
129. Bachrach LK. Measuring bone mass in children: Can we really do it? *Hormone Research* 2006;65(SUPPL. 2):11-6.
130. Bachrach LK. Assessing bone health in children: Who to test and what does it mean? *Pediatric Endocrinology Reviews* 2005;2(suppl. 3):332-6.
131. Lorenc RS, Olszyński WP, Karczmarewicz E, editors. Densytometria Kości. Materiały Kursu Certyfikacyjnego Dla Lekarzy. ; 2006.
132. Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO et al. Dual Energy X-ray Absorptiometry Interpretation and Reporting in Children and Adolescents: The 2007 ISCD Pediatric Official Positions. *Journal of Clinical Densitometry* 2008;11(1):43-58.
133. Hyams JS, Wyzga N, Kreutzer DL et al. Alterations in bone metabolism in children with inflammatory bowel disease: An in vitro study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1997;24(3):289-95.
134. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *British Medical Journal* 1996;312(7041):1254-9.
135. Kanis JA, Alexeeva L, Bonjour J- et al. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report. *Osteoporosis International* 1994;4(6):368-81.
136. Ward LM, Glorieux FH. The spectrum of pediatric osteoporosis. *Pediatric Bone: Biology and Diseases* 2003:401-42.
137. Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005;20(2):177-84.

138. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(2):348-60.
139. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004;19(7):1059-66.
140. Martin SW, Sommers JS, Holloway D. The pharmacokinetics of OPG following single dose subcutaneous and intravenous administration to healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1999;14(suppl. 1).
141. Lewiecki EM. RANK ligand inhibition with denosumab for the management of osteoporosis. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2006;6(10):1041-50.
142. Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2004;93(11):2645-68.
143. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density: Commentary. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2006;61(6):384-6.
144. Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Research and Therapy* 2007;9(SUPPL.1).
145. Byrne FR, Morony S, Warmington K et al. CD4+CD45RB^{hi} T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut* 2005;54(1):78-86.
146. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and Development* 1998;12(9):1260-8.
147. Książyk J. Ocena Stanu Odżywienia. w: *Żywnienie dzieci zdrowych i chorych*. red. Socha J. Warszawa: PZWL; 1998. p. 71-3.
148. Schoon EJ, Bollani S, Mills PR et al. Bone mineral density in relation to efficacy and side effects of budesonide and prednisolone in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005;3(2):113-21.
149. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. : Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.; 2001.
150. Bickel JP, Doksum KA. *Normal 0 21 Mathematical Statistics*. ; 2000.
151. R Development Core Team R. *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria; 2007.
152. *Terapeutyczne Programy Zdrowotne 2008. Leczenie choroby Leśniowskiego-Crohna*.

153. Pludowski P, Lebedowski M, Lorenc RS. Reference values for the indicators of skeletal and muscular status of healthy Polish children. *J Clin Densitom* 2005;8:164-77.
154. Schapira D, Schapira C. Osteoporosis: The evolution of a scientific term. *Osteoporosis Int* 1992;2(4):164-7.
155. Albright F, Bloomberg E, Smith AM. Postmenopausal osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians* 1940;55:298-305.
156. Peck WA, Burckhardt P, Christiansen C et al. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *American Journal of Medicine* 1993;94(6):646-50.
157. van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SMPF. Osteoporosis in childhood: Bone density of children in health and disease. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2001;14(7):817-32.
158. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115(12):3318-25.
159. Wong BR, Josien R, Lee SY et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(43):28355-9.
160. Varsani H, Patel A, van Kooyk Y et al. Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptors activator of NF- κ B (RANK). *Rheumatology* 2003;42(4):583-90.
161. Ito R, Nakayama H, Yoshida K et al. Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma. *Virchows Archiv* 2003;443(2):146-51.
162. Morony S, Warmington K, Adamu S et al. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 2005;146(8):3235-43.
163. Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* 2004;4(3):268-75.
164. Trofimov S, Pantsulaia I, Kobylansky E et al. Circulating levels of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. *European Journal of Endocrinology* 2004;150(3):305-11.
165. Rouster-Stevens KA, Langman CB, Price HE et al. RANKL : osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56(3):977-83.

166. Sylvester FA, Davis PM, Wyzga N et al. Are activated T cells regulators of bone metabolism in children with Crohn disease? *J Pediatr* 2006;148(4):461-6.
167. Rosso DA, Karis J, Braier JL et al. Elevated serum levels of the decoy receptor osteoprotegerin in children with langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Res* 2006;59(2):281-6.
168. Olesińska E, Majcher A, Misztal M et al. Stężenie osteoprotegeryny i receptora osteoprotegeryny (RANKL) w surowicy krwi u dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (MIZS). II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „*Uwarunkowania środowiskowe i profilaktyka chorób wieku rozwojowego*” październik 2008
169. Sarma PK, Misra R, Aggarwal A. Elevated serum receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase (MMP)3, and ProMMP1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol* 2008;27(3):289-94.
170. Dovio A, Data V, Angeli A. Circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: do they have a future in clinical practice? *Journal of endocrinological investigation*. 2005;28(10 Suppl):14-22.
171. Hawa G, Brinskelle-Schmal N, Glatz K et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) in serum. *Clinical Laboratory* 2003;49(9-10):461-3.
172. Buzi F, Maccarinelli G, Guaragni B et al. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factors κ B (RANKL) concentrations in normal children and in children with pubertal precocity, Turner's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60(1):87-91.
173. Yano K, Tsuda E, Washida N et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: Increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999;14(4):518-27.
174. Turk N, Cukovic-Cavka S, Korsic M et al. Proinflammatory cytokines and receptor activator of nuclear factor κ B-ligand/osteoprotegerin associated with bone deterioration in patients with Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009;21(2):159-166.
175. Alvarez L, Peris P, Guañabens N et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: Relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum* 2003;48(3):824-8.
176. Chan BYY, Buckley KA, Durham BH et al. Effect of Anticoagulants and Storage Temperature on the Stability of Receptor Activator for Nuclear Factor- κ B Ligand and Osteoprotegerin in Plasma and Serum. *Clinical Chemistry* 2003;49(12):2083-5.

177. Civitelli F, Paganelli M, Strappini PM et al. The role of RANKL/OPG system in bone loss in children with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* 2006;38(10):A102-.
178. Honsawek S, Chaiwatanarat T, Vejchapipat P et al. Relationships between OPG, RANKL, bone metabolism, and bone mineral density in biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2009;25(3):261-7.
179. Bernstein CN. Osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006;4(2):152-6.
180. Vestergaard P, Mosekilde L. Fracture risk in patients with celiac disease, Crohn's disease, and ulcerative colitis: A nationwide follow-up study of 16,416 patients in Denmark. *American Journal of Epidemiology* 2002;156(1):1-10.
181. Stockbrügger RW, Schoon EJ, Bollani S et al. Discordance between the degree of osteopenia and the prevalence of spontaneous vertebral fractures in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2002;16(8):1519-27.
182. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P et al. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: A population-based study. *Am J Epidemiol* 1999;149(10):916-24.
183. Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L et al. Fracture risk is increased in crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Gut* 2000;46(2):176-81.
184. Mølgaard C, Thomsen BL, Michaelsen KF. Influence of weight, age and puberty on bone size and bone mineral content in healthy children and adolescents. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 1998;87(5):494-9.
185. Glüer C-. Quantitative ultrasound techniques for the assessment of osteoporosis: Expert agreement on current status. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997;12(8):1280-8.
186. Yeap SS, Pearson D, Cawte SA et al. The relationship between bone mineral density and ultrasound in postmenopausal and osteoporotic women. *Osteoporosis Int* 1998;8(2):141-6.
187. Yu W, Gluer C-, Grampp S et al. Spinal bone mineral assessment in postmenopausal women: A comparison between dual X-ray absorptiometry and quantitative computed tomography. *Osteoporosis Int* 1995;5(6):433-9.
188. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P et al. Ultrasound measurements of calcaneus for estimation of skeletal status in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(8):790-7.
189. Gilsanz V, Boechat MI, Roe TF et al. Gender differences in vertebral body sizes in children and adolescents. *Radiology* 1994;190(3):673-7.

190. Sundberg M, Gärdsell P, Johnell O et al. Comparison of quantitative ultrasound measurements in calcaneus with DXA and SXA at other skeletal sites: A population-based study on 280 children aged 11-16 years. *Osteoporosis Int* 1998;8(5):410-7.
191. Sawyer A, Moore S, Fielding KT et al. Calcaneus ultrasound measurements in a convenience sample of healthy youth. *Journal of Clinical Densitometry* 2001;4(2):111-20.
192. Bachrach LK. Osteoporosis and measurement of bone mass in children and adolescents. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2005;34(3):521-35.
193. Bachrach LK. Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) measurements of bone density and body composition: Promise and pitfalls. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2000;13(SUPPL. 2):983-8.
194. Rauch F, Schoenau E. Changes in bone density during childhood and adolescence: An approach based on bone's biological organization. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(4):597-604.
195. Mora S, Bachrach L, Gilsanz V. Normal 0 21 Non-Invasive Techniques for Bone Mass Measurement. In: Glorieux F, Pettifor J, Juppner H, editors. San Diego: Academic Press; 2003. p. 303-24.
196. Walther F, Fusch C, Radke M et al. Osteoporosis in pediatric patients suffering from chronic inflammatory bowel disease with and without steroid treatment. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2006;43(1):42-51.
197. Bernstein CN, Seeger LL, Sayre JW et al. Decreased bone density in inflammatory bowel disease is related to corticosteroid use and not disease diagnosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995;10(2):250-6.
198. Semeao EJ, Jawad AF, Stouffer NO et al. Risk factors for low bone mineral density in children and young adults with Crohn's disease. *Journal of Pediatrics* 1999;135(5):593-600.
199. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2003;124(3):795-841.
200. Boot AM, Bouquet J, Krenning EP et al. Bone mineral density and nutritional status in children with chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42(2):188-94.
201. Persad R, Jaffer I, Issenman RM. The prevalence of long bone fractures in pediatric inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2006;43(5):597-602.
202. Bernstein CN, Blanchard JF, Leslie W et al. The incidence of fracture among patients with inflammatory bowel disease: A population-based cohort study. *Annals of Internal Medicine* 2000;133(10):795,799 I50.

203. Loftus EV, Crowson CS, Sandborn WJ et al. Long-term fracture risk in patients with Crohn's disease: A population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002;123(2):468-75.
204. Klaus J, Armbrecht G, Steinkamp M et al. High prevalence of osteoporotic vertebral fractures in patients with Crohn's disease. *Gut* 2002;51(5):654-8.
205. Bernstein CN, Leslie WD, Taback SP. Bone density in a population-based cohort of premenopausal adult women with early onset inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* 2003;98(5):1094-100.
206. Paganelli M, Albanese C, Borrelli O et al. Inflammation is the main determinant of low bone mineral density in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13(4):416-23.
207. Krześlek E, Iwańczak B. Estimation of the frequency of osteopenia and osteoporosis in inflammatory bowel disease in children. *Gastroenterologia Polska* 2006;13(2):105-9.
208. Sylvester FA, Wyzga N, Hyams JS et al. Natural history of bone metabolism and bone mineral density in children with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13(1):42-50.
209. Bartram SA, Peaston RT, Rawlings DJ et al. Multifactorial analysis of risk factors for reduced bone mineral density in patients with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(35):5680-6.
210. Andreassen H, Hylander E, Rix M. Gender, age, and body weight are the major predictive factors for bone mineral density in Crohn's disease: A case-control cross-sectional study of 113 patients. *American Journal of Gastroenterology* 1999;94(3):824-8.
211. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth J- et al. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(3):185-91.
212. Schoon EJ. Bone mineral density in patients with recently diagnosed inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119(5):1203-8.
213. Motil KJ, Grand RJ, Maletskos CJ et al. The effect of disease, drug, and diet on whole body protein metabolism in adolescents with Crohn disease and growth failure. *J Pediatr* 1982;101(3):345-51.
214. Kelts DG, Grand RJ, Shen G. Nutritional basis of growth failure in children and adolescents with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979;76(4):720-7.
215. Bernstein CN, Leslie WD. Therapy insight: Osteoporosis in inflammatory bowel disease - Advances and retreats. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 2005;2(5):232-9.

216. Sapone N, Pellicano R, Simondi D et al. A 2008 panorama on osteoporosis and inflammatory bowel disease. *Minerva Med* 2008;99(1):65-71.
217. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1994;20(3):629-50.
218. Lian JB, Shalhoub V, Aslam F et al. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: Dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 1997;138(5):2117-27.
219. Weinstein RS, Jilka RL, Michael Parfitt A et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102(2):274-82.
220. Ishida Y, Heersche JNM. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998;13(12):1822-6.
221. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 1987;121(6):1985-92.
222. McCulloch CAG, Tenenbaum HC. Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anatomical Record* 1986;215(4):397-402.
223. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: Relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology* 2001;40(1):74-83.
224. Gronowicz GA, McCarthy M-. Glucocorticoids inhibit the attachment of osteoblasts to bone extracellular matrix proteins and decrease β 1-integrin levels. *Endocrinology* 1995;136(2):598-608.
225. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-I in skeletal cells. *Endocrinology* 1990;126(3):1569-75.
226. Kim H-, Zhao H, Kitaura H et al. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *Journal of Clinical Investigation* 2006;116(8):2152-60.
227. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140(10):4382-9.

228. Von Tirpitz C, Epp S, Klaus J et al. Effect of systemic glucocorticoid therapy on bone metabolism and the osteoprotegerin system in patients with active Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003;15(11):1165-70.
229. Habtezion A, Silverberg MS, Parkes R et al. Risk factors for low bone density in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2002;8(2):87-92.
230. Adachi JD, Bensen WG, Bell MJ et al. Salmon calcitonin nasal spray in the prevention of corticosteroid-induced osteoporosis. *British Journal of Rheumatology* 1997;36(2):255-9.
231. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2001;29(6):498-505.
232. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Current Opinion in Rheumatology* 2003;15(4):454-7.
233. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P et al. Bone Mineral Density in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Prospective Two-Year Follow-Up Study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2004;39(2):145-53.
234. Robinson RJ, Al Azzawi F, Iqbal SJ et al. Osteoporosis and determinants of bone density in patients with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* 1998;43(11):2500-6.
235. Silvennoinen J, Karttunen TJ, Niemala SE et al. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37(1):71-6.
236. Roux C, Abitbol V, Chaussade S et al. Bone loss in patients with inflammatory bowel disease: A prospective study. *Osteoporosis International* 1995;5(3):156-60.
237. De Jong DJ, Corstens FHM, Mannaerts L et al. Corticosteroid-induced osteoporosis: Does it occur in patients with Crohn's disease? *American Journal of Gastroenterology* 2002;97(8):2011-5.
238. Van Staa TP, Cooper C, Leufkens HGM et al. Children and the Risk of Fractures Caused by Oral Corticosteroids. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18(5):913-8.
239. Motley RJ, Crawley EO, Evans C et al. Increased rate of spinal trabecular bone loss in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1988;29(10):1332-6.
240. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C et al. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40(2):228-33.
241. Schmidt S, Mellström D, Norjavaara E et al. Low bone mineral density in children and adolescents with inflammatory bowel disease: A population-based study from western Sweden. *Inflamm Bowel Dis* 2009;9999(9999):NA.

242. Leonard MB, Feldman HI, Shults J et al. Long-term, high-dose glucocorticoids and bone mineral content in childhood glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. *New England Journal of Medicine* 2004;351(9):868-75.
243. Sambrook PN, Eisman JA, Yeates MG. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: Safety of low dose corticosteroids. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1986;45(11):950-3.
244. Cohran VC, Griffiths M, Heubi JE. Bone mineral density in children exposed to chronic glucocorticoid therapy. *Clinical Pediatrics* 2008;47(5):469-75.
245. Schulte C, Dignass AU, Mann K et al. Reduced bone mineral density and unbalanced bone metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4(4):268-75.
246. Leonard MB. Glucocorticoid-induced osteoporosis in children: Impact of the underlying disease. *Pediatrics* 2007;119(SUPPL. 2):S166-74.
247. Staun M, Tjellksen L, Thale M et al. Bone mineral content in patients with Crohn's disease. A longitudinal study in patients with bowel resections. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1997;32(3):226-32.
248. Reed CA, Nichols DL, Bonnicksen SL et al. Bone mineral density and dietary intake in patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Densitometry* 1998;1(1):33-40.
249. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW et al. Tumor necrosis factor α -producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106(6):1455-66.
250. Azuma Y, Kaji K, Katogi R et al. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(7):4858-64.
251. Kaji K, Katogi R, Azuma Y et al. Tumor necrosis factor α -induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(9):1593-9.
252. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999;134(3):222-31.
253. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(5):2032-42.
254. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 2000;408(6812):600-5.

255. Cenci S, Toraldo G, Weitzmann M et al. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(18):10405-10.
256. Gao Y, Grassi F, Ryan MR et al. IFN- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117(1):122-32.
257. Lee C-, Eun YL, Son MC et al. Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor κ B, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *Arthritis and Rheumatism* 2004;50(12):3831-43.
258. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJH et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 1997;337(15):1029-35.
259. FDA Approves Remicade for Children with Crohn's Disease, <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108656.htm>.
260. Załącznik nr 1 do zarządzenia nr 101/2007/DGL Prezesa NFZ.
261. Wynands J, Belbouab R, Candon S et al. 12-month follow-up after successful infliximab therapy in pediatric crohn disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2008;46(3):293-8.
262. Bernstein M, Irwin S, Greenberg GR. Maintenance infliximab treatment is associated with improved bone mineral density in Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 2005;100(9):2031-5.
263. Lange U, Teichmann J, Müller-Ladner U et al. Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- α antibody: A prospective open-label pilot study. *Rheumatology* 2005;44(12):1546-8.
264. Miheller P, Muzes G, Rácz K et al. Changes of OPG and RANKL concentrations in Crohn's disease after infliximab therapy. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13(11):1379-84.
265. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MAC, Van Duijn W et al. Effect of the anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase-proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(2):200-10.
266. Josien R, Li H-, Ingulli E et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191(3):495-501.

267. Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B et al. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191(5):795-803.
268. Kung Y-, Felge U, Sarosi I et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402(6759):304-9.
269. Schoppet M, Hehser S, Ruppert V et al. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF- κ B-dependent. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;100(6):1430-9.
270. Sauter B, Albert ML, Francisco L et al. Consequences of cell death: Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191(3):423-33.
271. Reenaers C, Franchimont N, Oury C et al. Sensitivity of intestinal fibroblasts to TNF-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2008;43(11):1334-45.
272. Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PI et al. Colonic Dendritic Cells, Intestinal Inflammation, and T Cell-Mediated Bone Destruction Are Modulated by Recombinant Osteoprotegerin. *Immunity* 2003;19(6):849-61.
273. Ryan BM, Russel MGVM, Schurgers L et al. Effect of antitumour necrosis factor- α therapy on bone turnover in patients with active Crohn's disease: A prospective study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2004;20(8):851-7.
274. Abreu MT, Geller JL, Vasiliauskas EA et al. Treatment with infliximab is associated with increased markers of bone formation in patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40(1):55-63.
275. Franchimont N, Putzeys V, Collette J et al. Rapid improvement of bone metabolism after infliximab treatment in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2004;20(6):607-14.
276. Pullar T, Hunter JA, Capell HA. Effect of sulphasalazine on the radiological progression of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1987;46(6):398-402.
277. Frei P, Fried M, Hungerbühler V et al. Analysis of risk factors for low bone mineral density in inflammatory bowel disease. *Digestion* 2006;73(1):40-6.
278. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *Gut* 2006;55(suppl. 1):i36-58.

279. Travis SPL, Stange EF, Lémann M et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Gut* 2006;55(suppl. 1):i16-35.
280. Travis SPL, Stange EF, Lémann M et al. Corrigendum to "European-evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: Current management" [*J Crohns & Colitis* 2 (2008) 24-62] (DOI:10.1016/ j.crohns.2007.11.002). *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2(2):190.
281. Von Tirpitz C, Steder-Neukamm U, Glas K et al. Osteoporosis in Inflammatory Bowel Disease - Results of a Survey among Members of the German Crohn's & Ulcerative Colitis Association. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2003;41(12):1145-50.
282. Lehtonen-Veromaa MKM, Möttönen TT, Nuotio IO et al. Vitamin D and attainment of peak bone mass among peripubertal Finnish girls: A 3-y prospective study. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76(6):1446-53.
283. Kong Y-, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: A common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunology and Cell Biology* 1999;77(2):188-93.
284. Schoppet M, Hehser S, Ruppert V et al. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF- κ B-dependent. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;100(6):1430-9.
285. Walsh MC, Kim N, Kadono Y et al. Osteoimmunology: Interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual Review of Immunology* 2006;24:33-63.
286. Stolina M, Adamu S, Ominsky M et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005;20(10):1756-65.
287. Marshall MJ, Holt I, Davie MWJ. Osteoclast recruitment in mice is stimulated by (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate. *Calcified Tissue International* 1993;52(1):21-5.
288. Baldassano R, Braegger CP, Escher JC et al. Infliximab (REMICADE) therapy in the treatment of pediatric Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 2003;98(4):833-8.
289. Friesen CA, Calabro C, Christenson K et al. Safety of infliximab treatment in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004;39(3):265-9.
290. Rosh JR, Gross T, Mamula P et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma in adolescents and young adults with Crohn's disease: A cautionary tale? *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13(8):1024-30.

291. Thayu M, Markowitz JE, Mamula P et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma in an adolescent patient after immunomodulator and biologic therapy for Crohn disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2005;40(2):220-2.
292. McIntyre JA, Martín L. AMG-162: Treatment of osteoporosis bone cancer therapy treatment of rheumatoid arthritis human anti-RANKL monoclonal antibody. *Drugs of the Future* 2005;30(3):237-9.