

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Klinika Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych
i Dietetyki

**Polimorfizm genu receptora witaminy D i witamina D a gęstość
mineralna kości u pacjentów z zapalnymi chorobami jelit**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Aleksandra Szymczak-Tomczak

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Dobrowolska

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Iwona Krela-Kaźmierczak

Poznań 2018

Podziękowania

Pragnę złożyć serdecznie podziękowania wszystkim, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy.

Szanownej Pani Profesor dr hab. n. med. Agnieszce Dobrowolskiej dziękuję za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy, cenne rady, wsparcie oraz życzliwość w trakcie realizacji i redagowania pracy.

Pani Doktor n. med. Iwonie Kreli-Kaźmierczak dziękuję za wsparcie merytoryczne, życzliwość i okazaną pomoc, nieustanną motywację oraz wiele niewypowiedzianych rzeczy bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Panu Profesorowi dr hab. Ryszardowi Słomskiemu oraz Pracownikom Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu i Pracownikom Zakładu Funkcji Kwasów Nukleinowych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu dziękuję za pomoc w realizacji badań, ogromne wsparcie merytoryczne, na które zawsze mogłam liczyć, cierpliwość oraz poświęcony czas.

Śp. Panu Profesorowi dr hab. n. med. Krzysztofowi Linke oraz Pracownikom Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu dziękuję za pomoc w realizacji badań oraz wsparcie merytoryczne.

Śp. Pani Profesor dr hab. n. med. Wandzie Horst-Sikorskiej oraz Pracownikom Katedry Medycyny Rodzinnej UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu dziękuję za możliwość i pomoc w realizacji badań.

Pragnę także podziękować moim Rodzicom i Mężowi za cierpliwość i wsparcie w czasie powstawania dysertacji.

Bardzo serdecznie dziękuję.

Aleksandra Szymczak-Tomczak

Spis treści

1. Wstęp	8
1.1 Wprowadzenie	8
1.2 Nieswoiste choroby zapalne jelit	8
1.2.1 Charakterystyka ogólna nieswoistych chorób zapalnych jelit	8
1.2.2 Epidemiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit	10
1.2.3 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit.....	11
1.2.3.1 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki genetyczne	11
1.2.3.2 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki immunologiczne	12
1.2.3.3 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki środowiskowe	13
1.2.4 Leczenie	13
1.2.5 Objawy pozajelitowe	14
1.3 Osteoporoza	14
1.3.1 Definicja i klasyfikacja osteoporozy	14
1.3.2 Epidemiologia osteoporozy ze szczególnym uwzględnieniem chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	15
1.3.3 Etiologia i czynniki ryzyka osteoporozy w populacji ogólnej	15
1.3.4 Etiologia i czynniki ryzyka osteoporozy u chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit	17
1.3.5 Genetyczne podłoże osteoporozy	19
1.3.6 Objawy kliniczne osteoporozy	20
1.3.7 Profilaktyka i leczenie	20
1.4 Witamina D	21
1.4.1 Definicja, źródła i metabolizm witaminy D	21
1.4.2 Struktura zaopatrzenia w witaminę D w populacji ogólnej i u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	23
1.4.2.1 Pojęcie deficytu witaminy D i kryteria zaopatrzenia organizmu w witaminę D	23
1.4.2.2 Epidemiologia niedoborów witaminy D w populacji ogólnej	24
1.4.2.3 Epidemiologia niedoborów witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	24
1.4.2.4 Przyczyny niedoboru witaminy D w populacji ogólnej	25
1.4.2.5 Przyczyny niedoboru witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	26
1.4.3 Receptor witaminy D (vitamin D receptor – VDR)	26
1.4.4 Działanie witaminy D	27
1.4.4.1 Mechanizm kalcemiczny	27
1.4.4.2 Mechanizm plejotropowy	28
1.4.5 Witamina D a kość	28
1.4.6 Witamina D a układ immunologiczny	29
1.4.7 Znaczenie witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	30
1.5 Gen receptora witaminy D – VDR, jego polimorfizmy i efekt biologiczny	31

1.5.1	Gen receptora witaminy D – VDR – lokalizacja i budowa	31
1.5.2	Polimorfizmy genu receptora witaminy D (VDR)	33
1.5.3	Efekt biologiczny genu VDR i jego polimorfizmów	35
2.	Cel pracy i hipoteza badawcza	38
2.1	Cel pracy	38
2.2	Hipoteza badawcza	38
3.	Materiał i metody	39
3.1	Charakterystyka grupy badanej	39
3.2	Analiza genetyczna	40
3.2.1	Wykaz stosowanych roztworów i odczynników	40
3.2.2	Wykaz stosowanych buforów	40
3.2.3	Izolacja genomowego DNA z krwi pełnej metodą z izotiocyaninem guanidyny (GTC)	41
3.2.4	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	41
3.2.5	Hydroliza produktów PCR enzymami restrykcyjnymi – analiza RFLP i elektroforeza w żelu agarozowym	43
3.3	Oznaczanie poziomu witaminy D	44
3.3.1	Pobieranie i przygotowanie materiału	44
3.3.2	Odczynniki – roztwory robocze	44
3.3.3	Zasada pomiaru	44
3.4	Densytometria kości metodą DEXA	45
3.5	Analiza bioinformatyczna	47
3.5.1	Analiza zgodności z rozkładem Hardy’ego-Weinberga	47
3.5.2	Analiza statystyczna wyników	47
4.	Wyniki	48
4.1	Porównanie grupy badanej i grupy kontrolnej pod względem analizowanych parametrów	48
4.2	Osteoporoza i osteopenia u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego	50
4.3	Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego	52
4.4	Związki między stężeniem witaminy D a cechami morfologicznymi i gęstością mineralną kości w badanych grupach	53
4.5	Związki między gęstością mineralną kości a danymi morfologicznymi w badanych grupach	54
4.6	Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.....	57
4.7	Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.....	58
4.8	Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	59
4.9	Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	60
4.10	Porównanie genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych	62

4.11	Porównanie genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych	63
4.12	Porównanie genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych	65
4.13	Porównanie genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych	67
4.14	Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C)	70
4.15	Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) ...	78
4.16	Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) ..	85
4.17	Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C)	94
4.18	Graficzne podsumowanie międzygrupowych porównań analizowanych zmiennych ilościowych (podrozdziały 4.12-4.17)	102
5.	Dyskusja	107
5.1	Wprowadzenie	107
5.2	Porównanie grupy badanych chorych i grupy kontrolnej	108
5.3	Witamina D	108
5.3.1	Stężenie witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej	108
5.3.2	Witamina D a cechy morfologiczne	111
5.3.3	Witamina D a gęstość mineralna kości	113
5.4	Gęstość mineralna kości	114
5.4.1	Gęstość mineralna kości u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit	114
5.4.2	Gęstość mineralna kości a cechy morfologiczne	117
5.5	Polimorfizmy genu receptora witaminy D	119
5.5.1	Częstość występowania i związek polimorfizmów genu VDR z występowaniem nieswoistych chorób zapalnych jelit	119
5.5.2	Związek polimorfizmów genu VDR ze stężeniem witaminy D	121
5.5.3	Polimorfizmy genu VDR a gęstość mineralna kości	122
5.6	Podsumowanie	124
6.	Wnioski	126
7.	Streszczenie	128
8.	Summary	132
9.	Bibliografia	136
10.	Spis tabel	154
11.	Spis rycin	156

Wykaz stosowanych skrótów

25OHD	kalcyfediol, witamina D
5-ASA	kwas 5-aminosalicylowy
ACG	Amerykańskie Towarzystwo Gastroenterologii (<i>American College of Gastroenterology</i>)
ATG 16L	gen kodujący białko 16-1 związane z autofagią (<i>autophagy-related protein 16-1 gene</i>)
BMD	gęstość mineralna kości (<i>bone mineral density</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
BMP	gen kodujący białko morfogenetyczne kości (<i>bone morphogenetic protein gene</i>)
CaBP	białko wiążące wapń (<i>calcium binding protein</i>)
CDAI	Skala aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (<i>Crohn's Disease Activity Index</i>)
COLIA	gen kodujący kolagen
CRP	białko C-reaktywne (<i>C-reactive protein</i>)
CT	tomografia komputerowa (<i>computed tomography</i>)
CYP27B1	1-alpha-hydroxylaza
D/I	delecja-utrata/insercja (<i>deletion/insertio</i>)
DBD	domena wiążąca DNA (<i>DNA-binding domain</i>)
DEXA	technika podwójnej wiązki promieniowania Rtg (<i>dual energy X-ray absorptiometry</i>)
DLG5	gen kodujący białko DLG5 (<i>disks large homolog 5 gene</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
ECCO	Europejskie Stowarzyszenie Chorych na Nieswoiste Choroby Zapalne Jelit (<i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>)
ECM1	gen kodujący białko macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>extracellular matrix protein 1gene</i>)
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
FGF23	fosfatonina
GK	grupa kontrolna
GKS	glikokortykosteroidy
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTC	izotiocyjanian guanidyny
GWAS	analiza asocjacyjna całego genomu (<i>genome-wide association study</i>)
IBD	nieswoiste choroby zapalne jelit (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>)
IFN	interferon
IL-23R	gen kodujący receptor interleukiny 23 (<i>interleukin 23 receptor gene</i>)
IOF	Międzynarodowa Fundacja Osteoporozy (<i>International Osteoporosis Foundation</i>)
IRGM	gen kodujący białko rodziny M GTPaz związane z odpornością (<i>immunity-related GTPase family M protein gene</i>)
kpz	kilo par zasad
LBD	domena wiążąca ligand (<i>ligand binding domain</i>)
LC	choroba Leśniowskiego-Crohna

LRRK2	gen kodujący bogatą w leucynę kinazę(<i>leucine-rich repeat kinase 2 gene</i>)
MRI	rezonans magnetyczny (<i>magnetic resonance imaging</i>)
NChZJ	nieswoiste choroby zapalne jelit
NF-κB	czynnik transkrypcyjny (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji (<i>next generation sequencing</i>)
NOD2/CARD15	gen kodujący wewnątrzkomórkowy receptor rozpoznający wzorce (<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing/caspase recruitment domain family, member 15 gene</i>)
ns	brak istotności (<i>non-significant</i>)
OCTN1/OCTN2	gen kodujący transporter kationów organicznych (<i>carnitine/organic cation transporter gene</i>)
OPG	osteoprotegeryna
OR	iloraz szans (odds ratio)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PTGR4	gen kodujący receptor prostaglandyny E2 (<i>prostaglandin E2 receptor 4 gene</i>)
PTH	parathormon
r	współczynnik korelacji
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (<i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i>)
RFLP	polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RXR	receptor kwasu retinowego (<i>retinoid X receptor</i>)
SKU	bliższy koniec (szyjka) kości udowej
SKU	szyjka kości udowej
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SP1	czynnik transkrypcyjny Sp1 (<i>specific protein 1</i>)
STAT3	gen kodujący przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji (<i>signal transducer and activator of transcription 3 gene</i>)
TBE	bufor TBE
TGF	transformujący czynnik wzrostu (<i>transforming growth factor</i>)
Th	limfocyty pomocnicze (<i>T helper</i>)
TLR4	receptor Toll-podobny (<i>toll like receptor 4 gene</i>)
TNF	czynnik martwicy guza (<i>tumor necrosis factor</i>)
UVB	promienie ultrafioletowe B
VDR	receptor witaminy D (<i>vitamin D receptor</i>)
VDREs	swoiste sekwencje DNA (<i>vitamin D responsive elements</i>)
VNTR	zmienna liczba powtórzeń tandemowych (<i>variable number of tandem repeats</i>)
vs	versus
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organisation</i>)
WZJG	wrzodzące zapalenie jelita grubego

1. Wstęp

1.1 Wprowadzenie

Nieswoiste choroby zapalne jelit i osteoporoza są jednostkami chorobowymi, u podłoża, których leżą zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Witamina D ze względu na swoje wielokierunkowe, zarówno kostne jak i pozakostne działanie jest przedmiotem zainteresowania naukowców, szczególnie w kontekście nieswoistych chorób zapalnych jelit. Liczne doniesienia podkreślają także rolę polimorfizmów genu receptora witaminy D w patogenezie osteoporozy i chorób autoimmunologicznych.

1.2 Nieswoiste choroby zapalne jelit

1.2.1 Charakterystyka ogólna nieswoistych chorób zapalnych jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ, Inflammatory Bowel Diseases - IBD) to grupa przewlekłych stanów zapalnych przewodu pokarmowego, wśród których wymienia się chorobę Leśniowskiego-Crohna (LC) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG). Ze względu na niejednoznaczny obraz kliniczny i trudności diagnostyczne wyodrębniono także grupę około 10% pacjentów u których zróżnicowanie obu jednostek chorobowych nie było możliwe, i pacjentów tych zakwalifikowano do grupy *indeterminate colitis*. Zmiany zapalne w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna mogą obejmować cały przewód pokarmowy od ust do odbytu, obejmując wszystkie warstwy jego ściany, natomiast zmiany zapalne u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego dotyczą błony śluzowej. Cechą charakterystyczną WZJG jest ciągłość zmian zapalnych mających początek w odbytnicy [1].

Wśród objawów ogólnych nieswoistych chorób zapalnych jelit wymienia się osłabienie, spadek masy ciała, stany podgorączkowe lub gorączkę [2]. W przypadku choroby Leśniowskiego-Crohna objawy miejscowe zależą od lokalizacji zmian – najczęściej zajęty jest końcowy odcinek jelita krętego – *ileum terminale* (u blisko 40 - 50% chorych), z czym wiążą się bóle w prawym dole biodrowym, badalny naciek zapalny (guz). Lokalizacja zmian w jelicie cienkim lub grubym manifestuje się biegunką. Z zajęciem górnego odcinka przewodu pokarmowego wiążą się owrzodzenia aftowe w jamie ustnej, dysfagia, odynofagia, wymioty [3]. Charakterystyczną cechą choroby Leśniowskiego-Crohna jest występowanie przetok wewnętrznych lub zewnętrznych – łączenie ich częstość ocenia się na 20-40% [4]. Najczęstszymi objawami wrzodziejącego zapalenia jelita grubego są krwiste biegunki, w okresie zaostrzeń choroby liczby wypróżnień może wynosić nawet ponad 20 na dobę wraz z towarzyszącymi obrzękami, tachykardią i cechami odwodnienia [5]. Przebieg zarówno

choroby Leśniowskiego-Crohna jak i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego charakteryzuje się naprzemiennym występowaniem okresów zaostrzeń i remisji.

Najważniejsze różnice kliniczne między chorobą Leśniowskiego-Crohna a wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Różnice kliniczne między chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) a wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG).

Objaw	LC	WZJG
krwawienie	rzadkie	bardzo częste
ból brzucha	silne, częste	niezbyt nasilone
wyczuwalny guz	dość częsty	bardzo rzadki
przetoki	znacznie częstsze	bardzo rzadkie
zajęcie odbytnicy	50%	95%
zmiany okołodbytowe	50-80%	5-18%
pseudopolipy	rzadsze	13-15%
toksyczne rozdęcie okrężnicy (megacolon toxicum)	rzadsze	3-4%
wolna perforacja	rzadsze	2-3%
zwężenie jelita	częste	rzadkie

Wg Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. [6]

Rozpoznanie stawia się na podstawie obrazu klinicznego, kryteriów radiologicznych i histopatologicznych. Nie ma złotego standardu diagnostycznego nieswoistych chorób zapalnych jelit. Ważnym elementem w diagnostyce NChZJ są badania endoskopowe, a podstawowym badaniem jest kolonoskopia. W obrazie endoskopowym w chorobie Leśniowskiego-Crohna charakterystyczne są zmiany o charakterze odcinkowym – obszary zmienione zapalnie sąsiadują z prawidłową błoną śluzową (*skip lesions*), zmiany występujące w ileum terminale i okołodbytowo, drobne aftowate owrzodzenia lub głębokie linijne podłużne i poprzeczne owrzodzenia dające obraz brukowania błony śluzowej [7]. U pacjentów z LC wykonuje się także gastroscopię w celu oceny zmian w górnym odcinku przewodu pokarmowego. Najbardziej typową cechą endoskopową u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jest ciągłość zmian rozpoczynających się w odbytnicy, ponadto

można zaobserwować zatarcie rysunku naczyniowego, obrzęk, kruchość i ziarninowanie śluzówki. Cennym narzędziem diagnostycznym wykorzystywanym w diagnostyce NChZJ są badania obrazowe – zaczynając od konwencjonalnego badania rentgenowskiego jamy brzusznej, ultrasonografii po metody zaawansowane jak enterografia lub enterokliza MRI (*magnetic resonance imaging*) i CT (*computed tomography*), które wykorzystywane są w szczególności w chorobie Leśniowskiego-Crohna w ocenie zmian zapalnych, zwężeń i przetok [2, 8]. W badaniu histopatologicznym obecność nacieku plazmocytarnego w okolicy dna krypt jelitowych, zaburzenie mikroarchitektoniki krypt i ropnie kryptowe mogą sugerować WZJG. W chorobie Leśniowskiego-Crohna w ścianie jelita obecne są nieserowaczące ziarniniaki zbudowane z komórek nabłonkowatych, komórek typu Langhansa i limfocytów. Bogata symptomatologia oraz nawrotowy charakter chorób niejednokrotnie utrudniają właściwe postawienie rozpoznania i różnicowanie.

1.2.2 Epidemiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit występują na całym świecie, jednak największa zachorowalność dotyczy rozwiniętych krajów Europy Północnej, Europy Zachodniej, Ameryki Północnej i Australii. Szacuje się, że chorych może być nawet około 3 mln osób w Europie. Roczna zapadalność na NChZJ w Europie wynosi 24,3 zachorowań/100 tys. w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i 12,7 zachorowań/100 tys. w odniesieniu do choroby Leśniowskiego-Crohna. Częstość występowania wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG) i choroby Leśniowskiego-Crohna (LC) wzrosła w Europie od 6,0/100 tys. osób na rok w przypadku WZJG i 1,0 /100 tys. osób na rok w przypadku LC w 1962 roku do 9,8/100 tys. osób na rok (WZJG) i odpowiednio 6,3 /100 tys. osób na rok (LC) w 2010 roku [9]. Wśród głównych powodów wzrostu zachorowań wymienia się zmiany społeczno-ekonomiczne i będące ich konsekwencją zmiany stylu życia, zwyczajów żywieniowych, standardów higienicznych oraz innych czynników składających się na tzw. „zachodni styl życia”, który może sprzyjać rozwojowi tych chorób [10]. Największa częstość występowania IBD odnotowano na Wyspach Owczych. NChZJ występują częściej u rasy białej, niż u rasy czarnej i Azjatów [11]. Choroba Leśniowskiego-Crohna występuje najczęściej u osób młodych między 16 a 25 rokiem życia. Początek choroby przypada zwykle na okres wczesnej dorosłości (między 25 a 35 rokiem życia), ale aż 20-25% przypadków obserwuje się w dzieciństwie [12]. Zdarzają się także zachorowania w wieku podeszłym (>65 roku życia). Według najnowszych danych prowadzonego w Polsce Rejestru Choroby Crohna zarejestrowano 6311 osób z tą chorobą (stan na styczeń 2018 roku) [13].

1.2.3 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit

Etiologia choroby nie jest w pełni poznana, postuluje się współdział czynników środowiskowych (bakterie wchodzące w skład flory jelitowej, dieta, związki chemiczne zawarte w pożywieniu i otoczeniu człowieka, palenie tytoniu), immunologicznych (zaburzenia w regulacji limfocytów T pomocniczych - Th) i genetycznych prowadzących do przewlekłego procesu zapalnego przewodu pokarmowego [14, 15].

1.2.3.1 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki genetyczne

Poszukiwanie genów związanych z ryzykiem zachorowania na choroby zapalne jelit i ich fenotypem jest znacznie utrudnione ze względu na zaangażowanie wielu genów, brak dziedziczenia mendlowskiego oraz udział w etiopatogenezie licznych czynników środowiskowych. Badania nad związkiem genów z patogenezą NChZJ prowadzone są z użyciem technik biologii molekularnej, a szczególnie przydatna jest analiza asocjacyjna całego genomu (GWAS, genome-wide association study) oraz sekwencjonowanie całych eksonów i genomów z użyciem techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS, next generation sequencing).

Dowodem na udział w etiologii nieswoistych chorób zapalnych jelit czynników genetycznych jest występowanie rodzinne a także większe prawdopodobieństwo wystąpienia choroby u bliźniaków jednojajowych niż dwujajowych (LC: 50 vs 4%; WZJG: 19 vs 0%) [16, 17, 18]. Badania wskazują, że posiadanie członka rodziny z rozpoznaną chorobą Leśniowskiego-Crohna znacznie zwiększa ryzyko zachorowania, przy czym ryzyko to jest mniejsze niż ryzyko zachorowania na wrzodziejące zapalenie jelita grubego w przypadku posiadania chorego krewnego pierwszego stopnia [18]. Odkryto 99 *loci* związanych ze skłonnością do NChZJ, w tym 71 związanych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i 47 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, a 28 związanych z obiema chorobami. Poznane geny kodują białka związane z rozpoznawaniem molekularnych wzorców patogenów (*NOD2/CARD15* (nucleotide-binding oligomerization domain containing/caspase recruitment domain family, member 15 gene), *TLR4* (toll like receptor 4 gene), *OCTN1/OCTN2* (carnitine/organic cation transporter gene)), autofagią (*ATG 16L* (autophagy-related protein 16-1 gene), *IRGM* (immunity-related GTPase family M protein), *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2 gene)), utrzymaniem homeostazy bariery nabłonkowej (*ECM1* (extracellular matrix protein 1), *OCTN1/2*, *DLG5* (disks large homolog 5), *PTGER4* (prostaglandin E2 receptor 4), różnicowaniem limfocytów (*IL-23R* (interleukin 23 receptor gene), *STAT3* (signal transducer

and activator of transcription 3 gene)) [19]. Najlepiej poznanym genem związanym z etiopatogenezą NChZJ jest gen *NOD2/CARD15* położony na chromosomie 16. Polimorfizmy tego genu zwiększają ryzyko choroby Leśniowskiego-Crohna, ale nie predysponują do wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Do chwili obecnej zidentyfikowano blisko 30 polimorfizmów tego genu związanych z ChLC, a polimorfizmy Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007insC odpowiadają za około 82% zmutowanych alleli [20]. Do zwiększenia ryzyka choroby Leśniowskiego-Crohna dochodzi na skutek zmniejszenia odpowiedzi cytokinowej indukowanej dipeptydem muramylowym, która to pełni istotne funkcje w kontroli mikrobioty jelitowej i hamuje rozwój stanu zapalnego poprzez działanie na poziomie molekularnym (spadek aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)) i komórkowym (hamowanie produkcji cytokin prozapalnych). Dowiedziono także związku między mutacją *NOD2/CARD15* a zajęciem jelita krętego, występowaniem zwężeń oraz mniejszą skutecznością farmakoterapii [21]. Geny *OCTN1/OCTN2* związek zarówno z ChLC i WZJG. Geny te kodują białka będące transporterami jonów. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna wyodrębniono mutację 1762C>T w genie *OCTN1* i 207G>C w genie *OCTN2*, zmiany te powodują zaburzenie transportu błonowego karnityny, co w konsekwencji powoduje ograniczenie jej ilości w tkankach. Ponadto mutacja w jednym z genów *OCTN* sprzyja wystąpieniu okołodbytniczej postaci choroby [22]. Według Stolla i współpracowników polimorfizm genu *DLG5* kodującego białko odpowiedzialne za utrzymanie struktury komórkowej, również wiąże się z wyższym ryzykiem zachorowania na nieswoiste choroby zapalne jelit [23, 24].

1.2.3.2 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki immunologiczne

Według badań przeprowadzonych w ostatnich latach jednym z czynników etiologicznych nieswoistych chorób zapalnych jelit jest nadmierna stymulacja i nieadekwatna regulacja układu immunologicznego jelita. Na szczególną uwagę wśród czynników immunologicznych zasługują cytokiny. U chorych w zmienionej śluzówce przewodu pokarmowego dochodzi do wzrostu liczby monocytów i aktywowanych makrofagów, które są źródłem interleukin inicjujących i podtrzymujących stan zapalny. Do cytokin tych należą IL-1alfa (interleukina 1alfa), IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, TNF (czynnik martwicy guza - *tumor necrosis factor*), IFN (interferon). W etiologii NChZJ istotną rolę odgrywają także cytokiny, które zmniejszając odpowiedź zapalną – IL-4, IL-10, IL-13. W chorobie Leśniowskiego-Crohna dominuje populacja limfocytów Th1 uwalniających TNF,

IFN, IL-2, IL-6, IL-8 i wspomagających odpowiedź komórkową [4]. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego dochodzi do aktywacji limfocytów Th1 i Th2 uwalniających IL-4, IL-5, IL-10 i TNF oraz warunkujących odpowiedź humoralną [1]. Zaobserwowano także oporność komórek na apoptozę i zaburzenia ich eliminacji z nacieków zapalnych, co powoduje nadmierną stymulację immunologiczną i powstanie stanu zapalnego.

1.2.3.3 Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit – czynniki środowiskowe

Istotną rolę w patogenezie nieswoistych chorób zapalnych jelit odgrywają czynniki środowiskowe, wśród których wymienia się palenie tytoniu, dietę, bakteryjną florę jelitową, infekcje wirusowe i bakteryjne, leki (głównie antybiotyki i niesteroidowe leki przeciwzapalne), depresja, stres. Związek między paleniem tytoniu a chorobami zapalnymi jelit należy do najlepiej przebadanych, ale mechanizm tego zjawiska nie jest w pełni poznany. Palenie wpływa na liczbę i rodzaj krążących limfocytów oraz na ilość wolnych rodników tlenowych. Ryzyko zachorowania na chorobę Leśniowskiego-Crohna wzrasta dwukrotnie u palaczy w porównaniu do osób, które nigdy nie paliły [25, 26]. Palenie zwiększa u tych chorych także ciężkość rzutów choroby, prawdopodobieństwo zabiegu operacyjnego oraz ryzyko nowotworzenia [27]. U palaczy ryzyko zachorowania na wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest mniejsze, wzrasta natomiast u chorych, którzy rzucili palenie. Zaburzenia mikroflory jelitowej, głównie wzrost liczby bakterii beztlenowych z rodzaju *Bacteroides* czy *Clostridium* może przyczyniać się do wzrostu zachorowalności na NChZJ. Związki chemiczne zawarte w diecie takie jak konserwanty, sztuczne barwniki i spulchniacze są substratami dla bakterii redukujących siarczany (SRB – sulphate-reducing bacteria), a produkty tej reakcji uszkodzają nabłonek jelit. Ponadto dieta bogata w sacharozę, węglowodany proste, a uboga w warzywa i owoce sprzyja stanom zapalnym przewodu pokarmowego, natomiast spożycie dużej ilości błonnika, którego źródłem są warzywa i owoce oraz kwasów omega-3 zmniejsza ryzyko wystąpienia NChZJ [28].

1.2.4 Leczenie

Na kompleksowe postępowanie w nieswoistych chorobach zapalnych jelit według ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) oraz Grupy Roboczej Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii i Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii składa się dieta, uzupełnianie niedoborów, leczenie farmakologiczne i w wybranych przypadkach chirurgiczne [2]. Stosowane leczenie farmakologiczne (5-ASA (kwas 5-amionosalicylowy), glikokortykosteroidy, tiopuryny, przeciwciała anty-TNF) ma za zadanie zmniejszenie

aktywności układu odpornościowego skierowanej przeciwko tkankom przewodu pokarmowego [29, 30]. Prowadzone są liczne badania nad zastosowaniem nowych leków oraz komórek macierzystych w terapii NChZJ. Głównymi celami leczenia są osiągnięcie remisji klinicznej i wygojenie zmian śluzówkowych (tzw. głęboka remisja). Celem leczenia podtrzymującego jest utrzymanie remisji, ograniczenie liczby zaostrzeń oraz zmniejszenie ryzyka wystąpienia powikłań [2, 5, 31].

1.2.5 Objawy pozajelitowe

Nieswoiste zapalne choroby jelit nie dotyczą tylko jednego organu i powinny być traktowane jako choroby układowe z uwzględnieniem szeregu manifestacji pozajelitowych, wśród których wymienia się zmiany stawowe w postaci zapalenia stawów, zmiany skórne (rumień guzowaty, piodermia zgorzelinowa), pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, zapalenia błon oka, kamicę nerkową i żółciową. Istotny problem medyczny stanowią także osteopenia i osteoporoza [32, 33].

1.3.Osteoporoza

1.3.1 Definicja i klasyfikacja osteoporozy

Termin osteoporoza wywodzi się z języka greckiego („osteon” - kość) i łacińskiego („porus” - dziura, ubytek). Pierwsza definicja osteoporozy została opublikowana w encyklopedii Trzaski, Everta i Michalskiego publikowanej w latach 1925-1938 i określała to schorzenie jako „zrzeszotnienie/gąbczenie” kości. W 1941 roku Albright określił osteoporozę jako „za mało kości w kości” [34]. Aktualnie osteoporoza jest definiowana jako systemowa metaboliczna choroba szkieletu, która charakteryzuje się postępującym ubytkiem masy kostnej, osłabieniem struktury przestrzennej kości i podatnością na złamania. W zależności od lokalizacji osteoporozę możemy podzielić na miejscową, dotyczącą szczególnego fragmentu szkieletu, bądź uogólnioną, obejmującą cały układ kostny. Osteoporoza uogólniona może mieć formę pierwotną (80% przypadków) bądź wtórną (20% przypadków). Osteoporoza pierwotna dzieli się na inwolucyjną i idiopatyczną, dotykającą dzieci, młodzież i dorosłych w średnim wieku. W osteoporozie inwolucyjnej wyróżnia się typ I i II. Typ I stanowi osteoporoza po menopauzie (80% przypadków), typ II czyli osteoporoza starcza, dotyczy osób obu płci po 70 roku życia (20% przypadków). Osteoporoza wtórna jest wynikiem ubytku masy kostnej wskutek obecności niektórych chorób lub przyjmowania leków mających wpływ na metabolizm kostny. Podstawą rozpoznania według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) i Międzynarodowej Fundacji Osteoporozy (ang. *International*

Osteoporosis Foundation, IOF) jest pomiar gęstości mineralnej kości (ang. *bone mineral density*, BMD) w odcinku lędźwiowym (L) kręgosłupa i bliższym końcu kości udowej (SKU) metodą DEXA (technika podwójnej wiązki promieniowania rentgenowskiego, ang. *dual energy X-ray absorptiometry*), na podstawie wskaźnika T (Tscore) wyrażanego jako liczba odchyłeń standardowych, przy czym punkt odniesienia stanowi szczytowa masa kostna. Przyjęto następujące kryteria diagnostyczne:

- Tscore >-1 SD – wartość prawidłowa
- Tscore od -1 do $-2,5$ SD – osteopenia
- Tscore $<-2,5$ SD – osteoporoza
- Tscore $<-2,5$ SD i złamanie osteoporotyczne – osteoporoza zaawansowana.

U młodych dorosłych i dzieci zaleca się uwzględniać wskaźnik Z (Zscore), dla którego punktem odniesienia jest grupa rówieśników [35, 36].

1.3.2 Epidemiologia osteoporozy ze szczególnym uwzględnieniem chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

Według danych szacunkowych ponad 200 milionów ludzi na świecie cierpi na osteoporozę [37]. W Stanach Zjednoczonych i Europie choruje na nią około 30% wszystkich kobiet po menopauzie. U co najmniej 40% tych kobiet i około 15-30% mężczyzn dojdzie do jednego lub więcej złamań osteoporotycznych w ciągu życia [38, 39]. W ostatnich latach obserwuje się wydłużenie okresu życia, wzrasta odsetek kobiet w okresie po menopauzie i osób w starszym wieku (powyżej 75 roku życia). Osoby te należą do grupy najwyższego ryzyka i są najbardziej narażone na rozwój osteoporozy [40].

Szacuje się, że na osteoporozę choruje w Polsce 25-30% kobiet i 8-12% mężczyzn, a większość z nich stanowią osoby nieświadome swojej choroby do momentu wystąpienia pierwszego złamania. Corocznie w Polsce odnotowuje się 167 tys. złamań osteoporotycznych [41].

Wśród pacjentów z zapalnymi chorobami jelit aż u 22-77% występuje osteopenia i u 17-41% osteoporoza [42]. Według niektórych danych pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna częściej mają niską masę kostną niż chorzy na wrzodziejące zapalenie jelita grubego [43].

1.3.3 Etiologia i czynniki ryzyka osteoporozy w populacji ogólnej

Do czynników ryzyka osteoporozy według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO) należą:

A) wiek – powyżej 65 roku życia dla kobiet i powyżej 70 roku życia dla mężczyzn. Powolny spadek masy kostnej rozpoczyna się już po osiągnięciu 30 r.ż. Szacuje się, że w ciągu całego życia kobiety ilość masy kostnej spada nawet o 50% [44];

B) płeć – osteoporoza dotyka trzykrotnie częściej kobiety niż mężczyzn, czego przyczyną są zmiany hormonalne np. będące konsekwencją menopauzy;

C) niska masa ciała (BMI <18 kg/m²). Kobiety ze szczupłą budową i małą masą ciała mają mniejszą masę kostną i mniej tkanki tłuszczowej (w której dochodzi do konwersji androgenów nadnerczowych do estrogenów mających korzystny wpływ na gęstość mineralną kości). Osoby z BMI <20 kg/m² częściej ulegają złamaniom niż pacjenci z BMI 25 kg/m², wykazano natomiast, że BMI >30 kg/m² nie zmniejsza ryzyka zachorowania na osteoporozę [45].

D) osteoporoza u matki – skłonność wystąpienia osteoporozy jest nawet w 85% uwarunkowana genetycznie

E) rasa – choroba znacznie częściej rozwija się u osób rasy kaukaskiej niż czarnej. Wysokie ryzyko zachorowania dotyczy także kobiet pochodzenia azjatyckiego [46];

F) uprzednio przebyte złamania przyiskoenergetycznym urazie, głównie po 40 roku życia;

G) niska masa kostna na poziomie osteopenii lub osteoporozy;

H) wczesna menopauza naturalna (<45. rż.), chirurgiczna lub farmakologiczna. Wyższe ryzyko zachorowania odnotowano także u kobiet, u których pierwsza miesiączka wystąpiła po 16 r.ż lub u których wystąpił długotrwały brak miesiączki [47].

I) leki - glikokortykosteroidy (GKS) ogólnoustrojowe, obecnie lub w przeszłości (prednizon ≥5 mg/d lub równoważna dawka innego GKS stosowana przez >3 mies.); heparyna, metotreksat, leki przeciwpadaczkowe, preparaty T3 i T4, sole litu;

J) czynniki środowiskowe - dieta ubogowapniowa i ubogobiałkowa, niedobór witaminy D, nadmierne spożywanie kawy, niedożywienie, brak ruchu, palenie papierosów, nadużywanie alkoholu (>30g/d);

K) skłonność do upadków;

L) choroby, w wyniku których dochodzi do rozwoju osteoporozy wtórnej

a) endokrynopatie (pierwotny i wtórny brak miesiączki, zaburzenia miesiączkowania przebiegające z hipoestrogenizmem, hipogonadyzm, pierwotna nadczynność przytarczyc, nadczynność tarczycy, nadczynność kory nadnerczy (zespół Cushinga))

b) choroby gastroenterologiczne (choroba trzewna i zespoły złego wchłaniania, zespoły poresekcyjne, choroby zapalne jelit, ciężka niewydolność wątroby, pierwotna marskość żółciowa, stan po operacyjnym leczeniu otyłości)

c) stany niedożywienia

d) choroby powodujące zaburzenia czynności układu ruchu (zapalne układowe choroby reumatyczne, zapalenia swoiste i nieswoiste kości i stawów, stany po urazach układu ruchu, wady wrodzone układu ruchu, choroba zwyrodnieniowa stawów obwodowych i kręgosłupa, zespoły poporażenne, choroba Parkinsona, choroba Alzheimer, unieruchomienie)

e) choroby nerek

f) choroby nowotworowe

g) cukrzyca [35, 48].

1.3.4 Etiologia i czynniki ryzyka osteoporozy u chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit

Etiologia ubytku masy kostnej u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit jest wieloczynnikowa, a główne czynniki ryzyka pozostają ze sobą w dynamicznej równowadze [49].

Do czynników ryzyka osteoporozy u chorych z NChZJ należą:

A) zapalenie

Proces zapalny, zarówno miejscowy zlokalizowany w jelicie, jak i systemowy wiąże się z uwolnieniem z pobudzonych limfocytów T cytokin prozapalnych takich jak interleukina-1 (IL-1), interleukina-2 (IL-2), interleukina-6 (IL-6), interleukina-11 (IL-11), interleukina-17 (IL-17), czynnik martwicy nowotworów (TNF alfa), prostaglandyna E2 (PGE2) [49]. Substancje te pobudzają aktywację osteoklastów, zwiększają ekspresję RANKL na osteoblastach co z kolei stymuluje osteoklastogenezę oraz nasilają apoptozę osteoblastów prowadząc do ubytku masy kostnej [50].

B) niedożywienie i zaburzenia wchłaniania

Innym potencjalnym czynnikiem utraty kości w NChZJ jest zmniejszenie spożycia składników odżywczych i ich wchłanianie. Pacjenci z chorobami zapalnymi jelit spożywają mniej pokarmów o wysokiej zawartości wapnia i witaminy D. W chorobie Leśniowskiego-Crohna, która często zajmuje jelito cienkie, może dojść do zaburzeń wchłaniania wapnia i witaminy D [51]. Aktywne zapalenie w końcowym odcinku jelita krętego może prowadzić do upośledzenia reabsorpcji soli kwasów żółciowych, które w konsekwencji mogą zmniejszać wchłanianie

rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy D. Podobnie stany po resekcji jelita u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna prowadzą do zaburzeń wchłaniania witaminy D lub upośledzają krążenie jej metabolitów. U chorych ze świeżo zdiagnozowaną chorobą zapalną jelit i w fazie aktywnej choroby często stwierdza się także niską masę ciała. Niskie BMI (*body mass index*) jest jednym z najsilniejszych czynników predykcyjnych niskiej gęstości mineralnej kości [52].

C) stosowanie glikokortykosteroidów

Glikokortykosteroidy odgrywają ważną rolę w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit. Patogeneza osteoporozy posteroideowej jest złożona, a główne działanie tych leków na tkankę kostną polega na hamowaniu procesu kościotworzenia [53]. W konsekwencji dochodzi do zahamowania proliferacji i dojrzewania osteoblastów oraz do skrócenia czasu ich przeżycia. Glikokortykosteroidy wpływają również na produkcję cytokin, które działają na osteoblasty, natomiast działając bezpośrednio na osteoblast hamują syntezę kolagenu i osteokalcyny. Leki te hamują wchłanianie wapnia w przewodzie pokarmowym i powodują wzrost jego wydalania w nerkach, co może prowadzić do hipokalcemii i nadmiernej produkcji parathormonu. Glikokortykosteroidy wpływają także na układ RANK/RANKL/OPG nasilając tym samym osteoklastogenezę [54].

D) niedobór witaminy K

Niedobór witaminy K może być związany z osteopenią związaną z chorobą zapalną jelit. Przyczyny niskich stężeń witaminy K u pacjentów z chorobami zapalnymi jelit nie są do końca poznane. Niektórzy pacjenci mogą nie wchłaniać tej rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy z powodu ileopatii/enteropatii towarzyszącej chorobie. Niedobór może wynikać także ze zmienionej flory bakteryjnej jelita grubego, która produkuje witaminę K, do zmian biomu jelita może dochodzić na skutek antybiotykoterapii stosowanej w leczeniu NChZJ [55, 56].

E) hipogonadyzm

Wtórny brak miesiączki spowodowany aktywnością choroby u młodych kobiet z NChZJ prowadzi do utraty masy kostnej, u takich pacjentek zaleca się substytucję hormonalną pod nadzorem ginekologicznym. Wpływ spadku poziomu testosteronu u młodych mężczyzn z chorobami zapalnymi jelit, na masę kostną nie jest do końca poznany. W badaniu kohortowym przeprowadzonym w Anglii męski wtórny hypogonadyzm, niski wskaźnik androgenów i prawidłowy poziom gonadotropin związany ze zwiększonym obrotem kostnym wykazano u 6% badanych [57].

F) hiperhomocysteinemia

Homocysteina to aminokwas siarkowy, powstający u człowieka w wyniku demetylacji aminokwasu metioniny, pochodzącej ze spożywanego białka. Homocysteina moduluje proces

przebudowy tkanki kostnej za pomocą kilku mechanizmów, m.in. zwiększa aktywność osteoklastów, zmniejsza aktywność osteoblastów, zmniejsza przepływ krwi przez kość i działa bezpośrednio na macierz wiążąc się z nią bezpośrednio i zmniejszając wytrzymałość kości [58]. Na występowanie podwyższonego poziomu homocysteiny u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wpływają niedobory kobalaminy, kwasu foliowego i pirydoksyny [59].

1.3.5 Genetyczne podłoże osteoporozy

Osteoporoza jest chorobą o złożonej etiologii – silne podłoże genetyczne uwarunkowane wielogenowo jest dodatkowo modyfikowane przez liczne czynniki środowiskowe. Geny kontrolujące kostnienie i prawidłowe utrzymanie struktury tkanki kostnej należą do czterech grup czynników biologicznych: cytokin (*Il-1*, *Il-6*), czynników wzrostu (*TGFbeta1*(*transforming growth factor*), *TNF*), składników macierzy (*COLIA1*, *COLIA2*, *BGP*) oraz receptorów hormonów kalcytropowych (*VDR*, *ESR*) [60, 61].

Gen *COLIA1* (locus 17q21.3-q22 i 7q21.3-q22) koduje kolagen stanowiący główny składnik macierzy organicznej kości. Szczególne zainteresowanie naukowców budzi polimorfizm Sp1 tego genu. Wykazano związek polimorfizmu Sp1 z niską masą kostną i zwiększoną częstością złamań [62, 63]. Gen *ESR* zlokalizowany w locus 6q25.1, jest złożony z 8 eksonów i ma długość około 140 kilo par zasad. Koduje on izoformę ER α receptora estrogenowego, aktywowany ligandem czynnik transkrypcyjny złożony z kilku domen ważnych dla wiązania się z hormonem, wiązania DNA i aktywacji transkrypcji. Receptor estrogenowy pełni ważne funkcje w utrzymaniu homeostazy kostnej [64]. Polimorficzne warianty tego genu – PvuII i XbaI mają związek z obniżoną gęstością mineralną szyjki kości udowej [65]. Gen *LRP-5* (OMIM 603506) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 11 (11q12-13) i koduje transmembranowe białko LRP-5. W badaniu przeprowadzony w 2004 r przez Mizguchi i wsp. na grupie japońskich kobiet sugerowano, że *LRP-5* jest determinantą gęstości masy kostnej i przyczynia się do wzrostu ryzyka osteoporozy [66]. Kolejnym genem związanym z patogeneza osteoporozy jest gen białka morfogenetycznego - *BMP2* (OMIM 112261) zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 20 w pozycji 12.3 (20p12.3). Kodowane przez niego białko jest czynnikiem wzrostu należącym do nadrodziny białek TGF- β , stymuluje ono wzrost płytki chrzęstnej, bierze udział w procesie gojenia kości i odgrywa ważną rolę w regulacji osteogenezy [67].

U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit istotne związki z niską gęstością mineralną kości stwierdzono dla polimorfizmów genu *Il-6*, *IL1ra*, *COLIA1* i *VDR* [68, 69, 70].

Z uwagi na znaczenie układu osteoprotegeryny w regulacji gęstości mineralnej kości w chorobach zapalnych bada się polimorfizmy genu OPG. Wyniki badań są jednak sprzeczne – wykazano związek polimorfizmu genu *OPG* i *RANKL* z gęstością mineralną kości u młodych Kóreanek i Dunek [71, 72].

Dzięki prowadzonym na całym świecie badaniom genetyczne tło osteoporozy staje się coraz lepiej poznane i rozumiane. Sprzeczne wyniki badań i niejasności wymagają weryfikacji, z uwzględnieniem genetycznej różnorodności i interakcji gen—gen albo gen—środowisko. Badania genetyczne mogą stać się narzędziem do identyfikowania osób o większej podatności na zachorowanie i obciążonych wyższym ryzykiem powikłań.

1.3.6 Objawy kliniczne osteoporozy

Osteoporoza nazywana jest „cichym złodziejem kości” ze względu na długotrwały bezobjawowy przebieg. Kliniką manifestacją osteoporozy są złamania kości – głównie szyjki kości udowej (SKU), kręgow, żeber, kości ramiennej, kości promieniowej lub piszczelowej). Do złamań dochodzi zwykle w następstwie niewielkich urazów np. po upadku z pozycji stojącej, małego wysiłku fizycznego czy nieodpowiedniego ruchu – są to tzw. złamaniaiskoenergetyczne. Najwcześniej i najczęściej w przebiegu osteoporozy dochodzi do złamań kręgow. Złamania dotyczą najczęściej odcinka piersiowego i lędźwiowego. 25-30 % złamań kręgow objawia się zespołem bólowym kręgosłupa. Ból występuje nagle, ma charakter ostry, trwa kilka tygodni, nasila się w czasie ruchu i ustępuje w spoczynku. W przypadku licznych złamań i zapadnięć kręgow bóle mogą mieć charakter przewlekły. W osteoporozie z postępującymi zmianami chorobowymi dochodzi do obniżenia wzrostu, deformacji sylwetki w następstwie pogłębienia kifozy piersiowej, ograniczenia pojemności płuc, zaburzenia odpływu żylnego z dolnej połowy ciała i będącego konsekwencją powyższych zmian – wzrostu śmiertelności. Najgroźniejszą konsekwencją osteoporozy są złamania szyjki kości udowej. W ich wyniku ponad 50% chorych traci zdolność samodzielnego poruszania się. Według aktualnych danych jedna na pięć kobiet i jeden na trzech mężczyzn umiera już w pierwszym roku po złamaniu szyjki kości udowej [35, 36].

1.3.7 Profilaktyka i leczenie

Celem leczenia osteoporozy jest zmniejszenie ryzyka złamania kości i poprawa jakości życia [73]. Na leczenie składa się uzupełnienie niedoborów wapnia i witaminy D, leki aktywne w osteoporozie, zapobieganie upadkom i zdrowy styl życia [33, 36, 74]. Leki stosowane w leczeniu osteoporozy dzieli się na leki antyresorpcyjne (bisfosfoniany, denosumab,

hormonalna terapia zastępcza, selektywne modulatory receptorów estrogenowych), leki anaboliczne (teryparatydy), leki o mieszanym mechanizmie działania (ranelinian strontu). Profilaktyka osteoporozy skupia się na odpowiedniej diecie, regularnym wysiłku fizycznym, utrzymaniu prawidłowej masy ciała, unikaniu alkoholu i zaprzestaniu palenia papierosów [36, 75].

Szczególnie ważna jest profilaktyka i leczenie ubytku masy kostnej u pacjentów z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit. Według danych brytyjskich jedynie 5,6-14% pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit leczonych glikokortykosteroidami jest objętych profilaktyką osteoporozy [76, 77]. W zapobieganiu wystąpienia osteoporozy u tych chorych należy stosować preparaty witaminy D, suplementację wapnia i aktywność fizyczną, w przypadku pacjentów leczonych glikokortykosteroidami zaleca się ograniczenie stosowanej dawki do niezbędnego minimum. W razie wystąpienia złamań patologicznych u osób z osteoporozą należy rozpocząć terapię bisfosfonianami. European Crohn and Colitis Organisation (ECCO) nie zaleca stosowania tych leków w celu profilaktyki złamań kości u osób z obniżoną gęstością kości [78]. Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Gastroenterologii (ang. *American College of Gastroenterology*, ACG) pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, u których stwierdzono klasyczne czynniki ryzyka osteoporozy powinni zostać poddani badaniu przesiewowemu gęstości mineralnej kości w momencie rozpoznania i okresowo po postawieniu diagnozy [79].

Ryzyko rozwoju osteoporozy i jej powikłań powinno być szacowane indywidualnie dla każdego pacjenta z NChZJ i implikować odpowiedni sposób leczenia.

1.4 Witamina D

1.4.1 Definicja, źródła i metabolizm witaminy D

Witamina D należy do grupy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Istnieją dwie formy witaminy D – ergolacyferol (witamina D₂) występujący w roślinach i grzybach oraz cholekalcyferol (witamina D₃) wytwarzany w organizmach zwierzęcych. Witamina D spełnia w organizmie rolę prohormonu, ponieważ w wyniku przekształceń metabolicznych powstaje jej aktywna postać.

Głównymi źródłami witaminy D w organizmie są synteza skórna pod wpływem promieni słonecznych oraz podaż z pokarmem. Egzogenna witamina D jest dostarczana z pożywieniem (witamina D₂ – ergokalcyferol występuje w roślinach i grzybach; cholekalcyferol – witamina D₃ w rybach morskich, tranie, jajach, wątrobie zwierzęcej i produktach mlecznych) [80, 81]. Pod wpływem promieniowania UVB o długości fali 290-315 nm obecny w błonie

komórkowej keratynocytów warstwy podstawnej i kolczystej naskórka oraz w fibroblastach skóry właściwej 7-dehydrocholesterol ulega nieenzymatycznej fotoizomeryzacji do cholekacyferolu (prewitaminy D). Zsyntetyzowana prewitamina D w temperaturze skóry ulega izomeryzacji dając cząsteczkę stabilną termodynamicznie. Efektywność syntezy witaminy D w skórze zależy m.in. od szerokości geograficznej, zanieczyszczenia powietrza, ilości melaniny w skórze, powierzchni odsłoniętego ciała, stosowania filtrów ochronnych oraz wieku [82]. W Europie Środkowej w okresie od października do marca nie ma optymalnych warunków słonecznych do powstawania wystarczającej ilości witaminy D. Najlepszy czas do syntezy skórnej panuje od kwietnia do września. W tym okresie osoby o jasnej karnacji powinny codziennie ekspozować przez 15 minut, między godziną 10.00 a 15.00, minimum 18% powierzchni ciała (przedramiona i podudzia), bez używania filtrów ochronnych [82]. Należy jednak rozważyć korzyści związane z ekspozycją na promieniowanie słoneczne a ryzykiem rozwoju nowotworów skóry. Dotyczy to szczególnie osób o jasnej karnacji oraz niemowląt poniżej 6. miesiąca życia, którym nie zaleca się bezpośredniej ekspozycji na słońce.

W jelicie czczym i końcowej części jelita krętego (*ileum terminale*) wchłania się blisko 80% dostarczonej z pokarmem witaminy D. W dalszej kolejności jest ona uwalniana z enterocytów poprzez tworzenie chylomikronów i transportowana przez układ chłonny do mięśni i tkanki tłuszczowej. Cholekacyferol drogą krwi przedostaje się do wątroby, gdzie ulega hydroksylacji z udziałem 25-hydroksylazy należącej do nadrodziny cytochromu P450 dając 25-hydroksy-cholekalcyferol (kalcydiol). Kolejnym etapem na drodze metabolizmu witaminy D jest zachodząca w kanalikach proksymalnych nerek hydroksylacja w pozycji 1 z udziałem α 1-hydroksylazy (CYP27B1) czego efektem jest powstanie jej aktywnej metabolicznie postaci - 1,25-dihydroksykalcyferolu (kalcytriolu). Obecność CYP27B1 stwierdza się także w tkance kostnej, wątrobie, skórze, jelicie grubym, gruczołach piersiowych, prostaty, łożysku oraz w makrofagach. Hydroksylacja w pozycji 1 α regulowana jest przez parathormon (PTH), insulinę i estrogeny a także obniżone stężenie wapnia i fosforu we krwi [83]. Katabolizm aktywnych metabolitów witaminy D zachodzi poprzez ich sprzęganie z kwasem glukoronowym i wydalanie wraz z żółcią, bądź sprzęganie z kwasem siarkowym i wydalanie z moczem. Alternatywnym szlakiem metabolicznym jest także synteza kwasu kalcitryonowego [83].

1.4.2 Struktura zaopatrzenia w witaminę D w populacji ogólnej i u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

1.4.2.1 Pojęcie deficytu witaminy D i kryteria zaopatrzenia organizmu w witaminę D

Stężenie 25(OH)D jest najlepszym markerem zaopatrzenia organizmu w witaminę D, ponieważ charakteryzuje się długim okresem połowicznego rozpadu, zależnością stężenia od syntezy skórnej, absorpcji jelitowej i katabolizmu. 25(OH)D jest także substratem do produkcji biologicznie czynnej formy witaminy D – 1,25(OH)₂D. Wskazania do oznaczenia 25(OH)D w surowicy krwi obejmują grupy chorych narażonych na ryzyko niedoborów witaminy D a także pacjentów, u których obniżone stężenie witaminy D współtowarzyszy chorobom pozaszkieletowym [84]. Jeszcze do niedawna stężenie 25(OH)D poniżej 10 ng/ml uważano za powiązane z zaburzeniami metabolizmu kostnego i definiowano jako ciężki niedobór witaminy D [85]. Według Amerykańskiego Instytutu Medycyny (IOM, Institute of Medicine) stężenie witaminy D wynoszące 20 ng/ml i więcej wystarcza do utrzymania odpowiedniego efektu jej działania u 97,5% populacji niezależnie od wieku [86]. Natomiast amerykańskie Towarzystwo Endokrynologiczne (Endocrine Society) definiują jako minimalne stężenie witaminy D wynoszące 30 ng/ml [87]. Aktualne, zgodne z wytycznymi dla Europy Środkowej opublikowanymi po wnikliwej analizie, przez zespół ekspertów pod kierownictwem profesora Pawła Płudowskiego, kryteria zaopatrzenia organizmu w witaminę D przedstawiono w tabeli 2. Wytyczne te obowiązują w populacji polskiej w odpowiednich grupach wiekowych.

Tabela 2. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25(OH)D w surowicy

Stężenie 25(OH)D w surowicy (ng/ml)	Kategoria
0-20	deficyt
>20-30	stężenie suboptymalne
>30-50	stężenie optymalne
>50-100	stężenie wysokie
>100	stężenie potencjalnie toksyczne
>200	stężenie toksyczne

Wg. Płudowski P. i wsp. Witamina D: Rekomendacje dawkowania w populacji osób zdrowych oraz w grupach ryzyka deficytów-wytyczne dla Europy Środkowej 2013 r. [84]

1.4.2.2 Epidemiologia niedoborów witaminy D w populacji ogólnej

Niedobór witaminy D wydaje się być problemem ogólnoswiatowym. Według danych szacunkowych blisko bilion osób na świecie cierpi z powodu niedoboru witaminy D [88]. Metaanaliza przeprowadzona przez Hilgera i współpracowników uwzględniająca 168 389 uczestników z 44 krajów wykazała poziom witaminy D poniżej 30 ng/ml u 88,1% badanych a 37,3 % badanych miało poziom witaminy D niższy niż 20 ng/ml [89]. W Stanach Zjednoczonych stężenie 25(OH)D poniżej 20 ng/ml zaobserwowano u 36% zdrowej populacji w wieku 18-29 lat., a odsetek ten zwiększył się do 41 % u osób w wieku 49-83 lat [90]. Niskie stężenie witaminy D (<20ng/ml) odnotowano także wśród mieszkańców nasłonecznionych regionów Zjednoczonych Emiratów Arabskich, Indii i Turcji [87]. Poziom witaminy D poniżej 30 ng/ml odnotowano u 79,6% kobiet w okresie pomenopauzalnym w populacji Europejskiej [91].

Niedobór witaminy D zdaje się być także istotnym problemem w populacji polskiej. W badaniu 448 mieszkańców województwa pomorskiego aż 84% badanych miało stężenie 25 (OH)D poniżej 20 ng/ml [92]. W badaniu 2687 osób pochodzących z 10 miast Polski przeprowadzonym przez Płudowskiego i współpracowników zaobserwowano niedobór witaminy D u 67,5% osób poddanych analizie, u ponad 90% uczestników badania poziom 25(OH)D był niższy niż 30 ng/ml [93]. Rozkład stężenia witaminy D pod względem wieku, płci, miejsca zamieszkania i cech antropometrycznych dla populacji polskiej nadal wymaga wnikliwych badań.

W grupie ryzyka niedoborów witaminy D znajdują się także kobiety ciężarne, karmiące piersią i ich potomstwo, a odsetek ten może sięgać nawet 73% [94]. Zmiany stężenia witaminy D w surowicy w zależności od pory roku odnotowano w klimacie umiarkowanym, podzwrotnikowym i zwrotnikowym [95]. W Polsce najwyższe stężenia obserwowano wczesną jesienią, natomiast minimalne na początku wiosny i zimą [96].

1.4.2.3 Epidemiologia niedoborów witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

Grupą szczególnie narażoną na niedobór witaminy D są pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Według najnowszych danych 22-70% pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i około 45% chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego ma niedobór witaminy D [97, 98, 99]. Niski poziom witaminy D stwierdzono także u pacjentów ze świeżo wykrytą chorobą. Poziom witaminy D <10ng/ml odnotowano nawet u 25% pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna [100].

1.4.2.4 Przyczyny niedoboru witaminy D w populacji ogólnej

Do głównych przyczyn niedoboru witaminy D należą:

- A) niedostateczna podaż z pokarmem – dieta uboga w produkty bogate w witaminę D
- B) zmniejszona synteza skórna

Efektywność syntezy skórnej witaminy D zmniejsza się o blisko 70% wraz ze starzeniem się organizmu, co konsekwencją zmniejszania się ilości 7-dehydrocholesterolu w skórze [101, 102]. Zawarty w skórze barwnik melanina także ogranicza produkcję witaminy D, ograniczając absorpcję fotonów promieniowania ultrafioletowego [103]. Duże znaczenie ma także powszechne stosowanie kremów z filtrami przeciwsłonecznymi, zmniejszona ekspozycja na promieniowanie słoneczne spowodowana porą roku (zima), wysoką szerokością geograficzną, spędzaniem wielu godzin dziennie w pomieszczeniach a także uwarunkowaniami kulturowymi związanymi z zakrywaniem ciała (np. czador w krajach arabskich) [104, 105, 106].

- C) zaburzenia wchłaniania

Poziom witaminy D jako substancji rozpuszczalnej w tłuszczach jest obniżony u osób, u których na skutek patologii przewodu pokarmowego lub stosowanego leczenia dochodzi do zaburzeń trawienia i wchłaniania tłuszczów, a także do zaburzeń krążenia jelitowo-wątrobowego. Do głównych przyczyn należą: celiakia, mukowiscydoza, choroby zapalne jelit, pierwotna marskość żółciowa wątroby, stan po gastrektomii, przewlekłe zapalenie trzustki i stosowanie cholestyraminy [107].

- D) nadmierny katabolizm

Leki przeciwdrgawkowe, antyretrowirusowe, tuberkulostatyki i glikokortykosteroidy zaburzają metabolizm witaminy D indukując mikrosomalne enzymy wątrobowe, co w konsekwencji przyspiesza glukuronidację i wydzielanie jej nieaktywnych metabolitów [108, 109].

- E) otyłość – z powodu zwiększonej ilości tkanki tłuszczowej dochodzi do sekwestracji witaminy D i utrudnienia jej transport do krwi [110, 111, 112, 113]
- F) choroby wątroby – w ciężkiej, niewyrównanej marskości wątroby dochodzi do zaburzeń hydroksylacji witaminy D [114]
- G) choroby nerek

W przebiegu zespołu nefrytycznego i przewlekłej choroby nerek dochodzi do zaburzenia syntezy skórnej witaminy D pod wpływem toksyn mocznicowych, zaburzonej hydroksylacji oraz nadmiernego wydalania witaminy D z moczem w przypadku nasilonego białkomoczu [115].

- H) choroby genetyczne – np. krzywica witamino-D zależna typu II spowodowana mutacją genu receptora tkankowego 1,25(OH)₂D.

1.4.2.5 Przyczyny niedoboru witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit stanowią grupę szczególnie narażoną na niedobór witamin D oraz związane z tym konsekwencje. Wśród głównych przyczyn niedoboru witaminy D wymienia się zmniejszoną ekspozycję na światło słoneczne często spowodowaną niechęcią chorych do opuszczania domu oraz nadmierną fotowrażliwością spowodowaną przez stosowane leki, nieodpowiednią dietę, palenie tytoniu, aktywna postać choroby, zmiany zapalne śluzówki jelita i stany po resekcji przewodu pokarmowego [116, 117, 118]. Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit często unikają pokarmów bogatych w witaminę D takich jak tłuste ryby i nabiał, które mogą zaostrzać objawy choroby. Chorzy ze zmianami zapalnymi w proksymalnej części jelita cienkiego często nie spożywają mleka i produktów mlecznych, gdyż mogą one prowadzić do nasilenia objawów chorobowych. U pacjentów z NChZJ często występują zaburzenia trawienia i wchłaniania tłuszczów, a co za tym idzie, witaminy D. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna lokalizacja zmian zapalnych w okolicy *ileum terminale* także hamuje wchłanianie witaminy D [83]. Zmieniona zapalnie błona śluzowa predysponuje do enteropatii z utratą białek, w tym białka wiążącego witaminę D (DBP – vitamin D binding protein) [119]. Stan po częściowej resekcji jelita cienkiego predysponuje do zaburzeń wchłaniania witaminy D zależnych od rozległości i lokalizacji zabiegu oraz sprzyja szybszej eliminacji metabolitów witaminy D w wyniku zaburzenia wątrobowo-jelitowego lipidów.

1.4.3 Receptor witaminy D (Vitamin D Receptor – VDR)

Aktywny metabolit witaminy D - 1,25(OH)₂D działa na komórki za pośrednictwem receptora witaminy D (Vitamin D Receptor – VDR). Receptor ten należy do grupy receptorów steroidowych, do II klasy receptorów jądrowych i pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego aktywowanego ligandem. Jego cząsteczka składa się z 427 aminokwasów, a masa cząsteczkowa wynosi 48,3 kDa [120]. Wśród składowych VDR wyróżniamy wysoce konserwatywną N-terminalną domenę wiążącą DNA (DBD, DNA binding domain) i α-helikalną C-terminalną domenę wiążącą ligand (LBD, ligand binding domain). Receptor występuje w tkankach związanych z gospodarką mineralną (kości, nerki, przytarczycy, jelito) oraz w skórze, prostaty, mięśniach, sutku, jelicie i mózgu. W następstwie związania 1,25(OH)₂D z receptorem poprzez odpowiednią domenę wiążącą dochodzi do heterodimeryzacji z receptorem kwasu 9-cis retinowego (RXR – retinoid X receptor) i zmiany konformacji przestrzennej receptora [121]. Następnie powstałe heterodimery wiążą się ze

swoistymi sekwencjami DNA (VDREs – vitamin D responsive elements), które są zlokalizowane w obszarze promotorowym genów docelowych oraz z szeregiem jądrowych białek korelatorowych (zwiększających bądź hamujących transkrypcję aktywowaną przez VDR). Receptor witaminy D reguluje ekspresję wielu genów w prawidłowych komórkach organizmu (m.in. geny osteokalcyny, kalbindyny, RANKL, 24-hydroksylazy, integryny, PTH, IL-2, IL-12, TNF α , GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), NF κ B) oraz w komórkach nowotworowych [122].

1.4.4 Działanie witaminy D

Działanie witaminy D na docelowe komórki, tkanki i narządy w organizmie człowieka odbywa się w dwojaki sposób. W mechanizmie pozagenowym wiąże się ono z aktywacją kinaz tyrozynowych z rodziny Src, co prowadzi do uruchomienia kaskady kinazy białkowej C lub kinazy aktywowanej mitogenem. Mimo toczących się badań, mechanizm ten pozostaje ciągle mechanizmem słabo poznanym [123]. Działanie genomowe odbywa się za pośrednictwem receptora witaminy D (VDR). Rozmieszczenie VDR w wielu tkankach determinuje działanie witaminy D na komórki w sposób klasyczny (kalcemiczny) czyli związany z homeostazą wapniowo-fosforanową i metabolizmem kostnym a także w sposób nieklasyczny (plejotropowy) [124].

1.4.4.1 Mechanizm kalcemiczny

Do najważniejszych efektów kalcemicznych witaminy D należą pobudzenie wchłaniania wapnia i fosforanów w przewodzie pokarmowym, zwiększanie wchłaniania zwrotnego wapnia w nerkach, pobudzenie obrotu kostnego, stymulowanie syntezy białka wiążącego witaminę D [125]. Witamina D działa na nabłonek jelitowy na kilka sposobów, z których każdy pobudza proces resorpcji wapnia z jelit. Absorpcja wapnia z jelit odbywa się na zasadzie transportu transcelularnego i paracelularnego. Transport transcelularny dominuje w proksymalnym odcinku jelita cienkiego a transport paracelularny w jelicie czym i końcowej części jelita cienkiego (lokalizacja charakterystyczna dla choroby Leśniowskiego-Crohna). Witamina D reguluje procesy transportu przezkomórkowego wzmacniając ekspresję nabłonkowego receptora wapniowego (TRPV6), kalbindyny i białka wiążącego wapń CaBP (*calcium binding protein*). Im więcej wapnia znajduje się w świetle jelita tym większa jest synteza CaBP. Transport paracelularny odbywa się na zasadzie zmiany przepuszczalności błony komórkowej enterocyta dla jonów wapnia. 1,25(OH) $_2$ D współdziałając

z parathormonem (PTH) stymuluje w nerkach wchłanianie zwrotne wapnia i fosforanów z płynu cewkowego do krwi, wpływa także pobudzająco na aktywność 24-hydroksylazy, a hamująco na 1alfa-hydroksylazę [83].

1.4.4.2 Mechanizm plejotropowy

Opublikowane w 1979 roku badania Stumpfa i współpracowników oraz odkrycie VDR w wielu tkankach umożliwiły poznanie nowych funkcji i mechanizmów działania witaminy D [126]. Wspomaga ona proliferację i różnicowanie komórek należących do układu immunologicznego, indukuje apoptozę komórek nowotworowych i spowalnia ich namnażanie, wpływa na stężenie cytokin pro- i przeciwzapalnych, zmniejsza wydzielanie reniny, wpływa na układ renina–angiotensyna–aldosteron, redukuje angiogenezę i korzystnie wpływa na procesy zwapnienia w naczyniach krwionośnych, stymuluje syntezę czynników neurotroficznych, hamuje procesy włóknienia w nerkach i zwiększa produkcję insuliny [127, 128, 129]. Hipotezę dotyczącą wielokierunkowego działania witaminy D potwierdzono w wielu badaniach obserwacyjnych, które wskazują na związek między niskim stężeniem witaminy D w surowicy krwi a zwiększonym ryzykiem: nowotworów okrężnicy, sutka, prostaty; stwardnienia rozsianego; cukrzycy typu 1 i 2, astmy, nieswoistych chorób zapalnych jelit; depresji; nadciśnienia tętniczego a także chorób układu sercowo-naczyniowego [130, 131, 132].

1.4.5 Witamina D a kość

Witamina D działa na kość w sposób bezpośredni i pośredni. Działanie bezpośrednie polega na wpływie na osteoblasty, osteocyty i osteoklasty. 1,25(OH)₂D reguluje transkrypcję genów, różnicowanie i mineralizację osteoblasta. Wpływa na produkcję kolagenu typu I i licznych białek niekolagenowych takich jak osteokalcyna, osteopontyna, sialoproteina kostna BSP1. Osteokalcyna i osteopontyna wiążą wapń i hydroksyapatyty przyczyniając się do odkładania ich w macierzy kości. Również sialoproteina przyczynia się do organizacji macierzy kostnej [133]. Pod wpływem witaminy D osteocyty produkują czynnik FGF23 – fosfatoninę, która reguluje nerkową hydroksylację 1,25(OH)₂D₃, hamuje reabsorpcję fosforanów i zmniejsza syntezę PTH. Witamina D jest także niezbędnym czynnikiem koniecznym do prawidłowego różnicowania się i funkcjonowania osteoklastów. Pobudza preosteoblasty do wydzielania czynnika stymulującego wzrost kolonii makrofagów (M-CSF), który z kolei aktywizuje preosteoklasty do proliferacji i zapobiega ich apoptozie. Na błonie preosteoklastów znajduje się receptor RANK, który łączy się z ligandem RANKL uwalnianym przez

preosteoblasty. Skutkuje to aktywacją szlaku różnicowania i aktywacji osteoklastów, powstaje dojrzała komórka. Białko osteoprotegeryna (OPG) z osteoblastów może wiązać się z RANKL i hamować jego połączenie z RANK, co hamuje szlak dojrzewania osteoklasta. Witamina D powoduje w osteoblastach wzrost ekspresji RANKL i hamuje ekspresję OPG przez co pobudza osteoklastogenezę [134]. Pośrednio witamina D działa na kość regulując gospodarkę wapniowo-fosforanową organizmu [135]. Do chwili obecnej przeprowadzono niewiele badań, których przedmiotem jest związek między stężeniem 25OHD a masą kostną u pacjentów z IBD. Wyniki tych doniesień różnią się – część badaczy podaje zależność między poziomem witaminy D a gęstością mineralną kości u dorosłych, podczas gdy inni naukowcy nie znajdują takiej zależności – pacjenci mają niskie BMD mierzone metodą DEXA w odcinku lędźwiowym kręgosłupa przy prawidłowym stężeniu witaminy D [136, 137, 138].

1.4.6 Witamina D a układ immunologiczny

Wiele badań klinicznych wskazuje na kluczową rolę witaminy D jako modyfikowalnego czynnika środowiskowego chorób autoimmunologicznych [139]. Wpływa ona na komórki immunologiczne, do których należą między innymi limfocyty T, limfocyty B i komórki dendrytyczne [140]. Każda z tych typów komórek wykazuje ekspresję receptora dla witaminy D (VDR) i produkuje 1 alfa-hydroksylazę i 24-hydroksylazę, co wpływa na lokalną produkcję aktywnej 1,25(OH)₂D. Jej funkcje autokryne i parakryne pozostają pod ścisłym wpływem systemu immunologicznego i zależą od odpowiedniego zaopatrzenia w krążącą 25(OH)D. Limfocyty pomocnicze T (Th) odgrywają kluczową rolę w antygenowo specyficznej reakcji immunologicznej. Wyróżniamy dwie populacje tych limfocytów: Th1 i Th2, które w czasie prawidłowej odpowiedzi immunologicznej pozostają w równowadze. Limfocyty Th1 wydzielają interferon gamma (IFN-gamma), interleukinę 1 (IL-2) i czynnik martwicy guza (TNF), a ich aktywacja jest charakterystyczna dla odpowiedzi gospodarza na istnienie guza lub patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak na przykład wirusy. Limfocyty Th2 wydzielają interleukinę 4 (IL-4), interleukinę 5 (IL-5), interleukinę 10 (IL-10) i interleukinę 13 (IL-13). Sygnałem do ich stymulacji jest obecność patogenów pozakomórkowych – bakterii lub pasożytów [141]. 1,25(OH)₂D działa na obie populacje limfocytów, a aktywacja limfocytów CD4⁺ powoduje pięciokrotny wzrost ekspresji receptora dla witaminy D (VDR). Witamina D hamuje proliferację limfocytów Th1 i obniża produkcję IFN-gamma, IL-2 oraz poprzez działanie na fenotyp Th2 wzmacnia ekspresję IL-4. W chorobach autoimmunologicznych Th1 skierowane są przeciwko białkom gospodarza, co skutkuje patologicznymi objawami. Wiele badań in vivo wskazuje na efektywność 1,25(OH)₂D w hamowaniu reakcji immunologicznej

zależnej od wydzielania IL-2 i IL-4 [142]. Komórki Th17 są subpopulacją limfocytów CD4+ mającą szczególne znaczenie w zapaleniu, które może prowadzić do zniszczenia tkanek. Witamina D hamuje odpowiedź autoimmunologiczną i tym samym destrukcję tkanek blokując wydzielanie przez komórki Th17 interleukiny 17 [143]. 1,25(OH)₂D działając na komórki jednojądrzaste hamuje także produkcję interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 6 (IL-6) i interleukiny 12 (IL-12), będących jednymi z najsilniejszych cytokin prozapalnych oraz stymuluje ekspresję przez limfocyty regulatorowe (Treg) związków o działaniu przeciwzapalnym: CTLA-4, FoxP3, interleukiny 10 (IL-10), TGF-beta [144, 145, 146]. Witamina D działa także na limfocyty B bezpośrednio zakłócając ich proces różnicowania i produkcję immunoglobulin. Kalcytriol wpływa ponadto na dojrzewanie komórek dendrytycznych obniżając ekspresję molekuł kostymulujących – CD40, CD80, CD86 oraz białek MHC II klasy.

1.4.7 Znaczenie witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

Niedobór witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit prowadzi nie tylko do osteomalacji - zaburzeń mineralizacji przy prawidłowej masie kostnej i osteoporozy – zmniejszenia masy kostnej prawidłowo zmineralizowanej. Istotny może być wpływ witaminy D na sam przebieg choroby poprzez modulację mechanizmów zapalnych. Obecnie szeroko dyskutuje się ich rolę w patogenezie nieswoistych chorób zapalnych jelit. W chorobie Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego dochodzi do zaburzeń regulacji limfocytów Th. W naciekach zapalnych w NChZJ dominują limfocyty Th1. Jako jeden z czynników etiologicznych w chorobach zapalnych jelit wymienia się także zaburzoną lokalną odpowiedź immunologiczną na antygeny bakteryjne u chorych genetycznie predysponowanych. Witamina D wpływa na przesunięcie fenotypu Th1 limfocytów do formy Th2. Przełomowe badanie Cantorny i wsp. wykazało, że aktywny metabolit witaminy D zapobiega i łagodzi objawy IBD u myszy pozbawionych IL-10 lub VDR [148, 149]. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna niedobór witaminy D jest więc nie tylko konsekwencją ale także przyczyną procesu zapalnego, który może doprowadzić do utraty masy kostnej poprzez odpowiedź immunologiczną mediowaną przez limfocyty Th1. Postuluje się także ujemny wpływ interleukin na masę kostną poprzez stymulację aktywności osteoklastów [150]. Tilag i wsp. udowodnili, że prozapalne cytokiny (TNF alfa, IL-1, IL-6 i interferon gamma), które w IBD nie tylko biorą udział w zapaleniu dotyczącym błony śluzowej lub systemowym ale także mogą prowadzić do utraty masy kostnej [151]. Ponadto w badaniach

Jorgensena i Mihellera wykazano zmniejszenie aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna wyrażonej w postaci wskaźnika aktywności choroby (CDAI, Crohn's Disease Activity Index) oraz spadek CRP u pacjentów, u których suplementowano witaminę D [152, 153].

Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit mają istotnie wyższe ryzyko zachorowania na raka jelita grubego. Witamina D hamuje i wpływa na różnicowanie wielu linii nowotworowych komórek, w tym także kolonocytów [154]. Wykazano, że pacjenci z wyższym stężeniem witaminy D mieli nawet o 50% niższe ryzyko zachorowania na raka jelita grubego w porównaniu do chorych deficytowych [155].

Niski poziom witaminy D może być związany ze zwiększonym ryzykiem operacji w chorobie Leśniowskiego-Crohna, a także ze wzrostem liczby hospitalizacji zarówno w chorobie Leśniowskiego-Crohna jak i we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [119, 156].

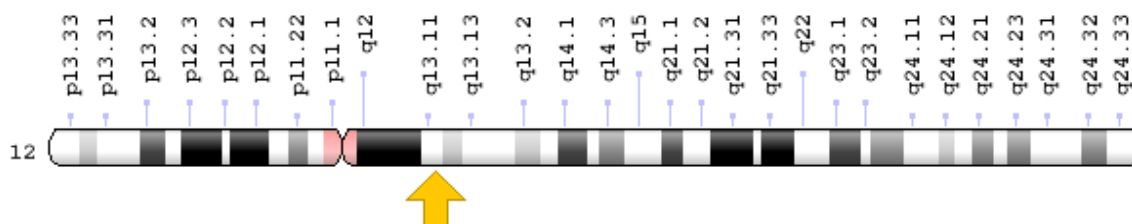
Wśród pacjentów z chorobami zapalnymi jelit często występują zaburzenia nastroju a w szczególności depresja, nasilane przez objawy chorobowe, częste hospitalizacje i niepowodzenia terapeutyczne. W badaniach obserwacyjnych wykazano, że pacjenci z depresją mieli niższe stężenie witaminy D niż osoby zdrowe. Suplementacja chorych witaminą D obniża punktację w skali Becka służącej do przesiewowego rozpoznania zaburzeń depresyjnych oraz poprawia nastrój w chorych [157, 158].

Na całym świecie podkreśla się konieczność prowadzenia większej liczby badań randomizowanych z podwójnie ślepą próbą w celu lepszego poznania roli witaminy D w etiopatogenezie, leczeniu i zapobieganiu nieswoistym chorobom zapalnym jelit.

1.5 Gen receptora witaminy D – VDR, jego polimorfizmy i efekt biologiczny

1.5.1 Gen receptora witaminy D – VDR – lokalizacja i budowa

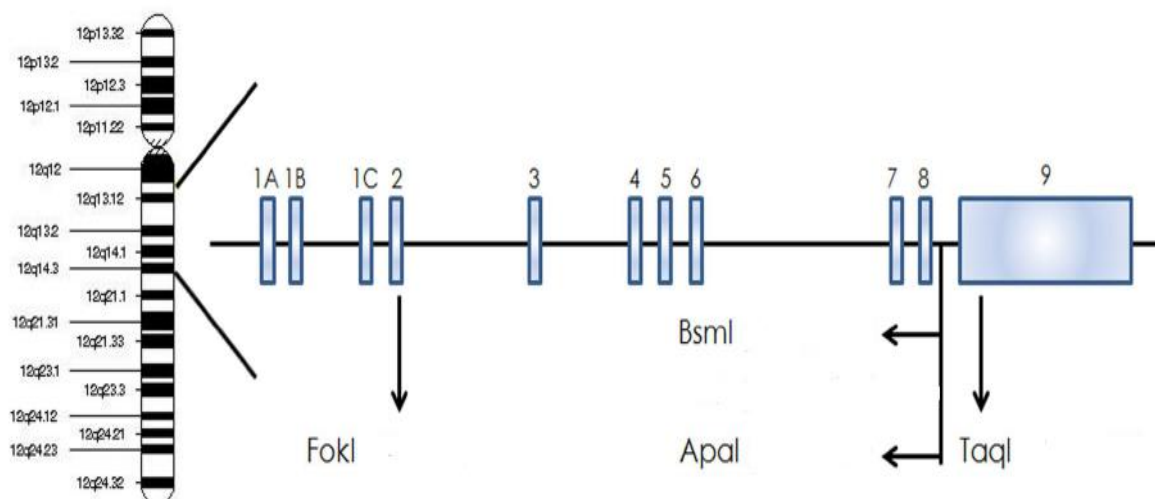
U człowieka gen receptora witaminy D – VDR (*vitamin D receptor*) zlokalizowany jest w regionie 13 na długim ramieniu (q) chromosomu 12 (12q13.11). (ryc.1)



Rycina 1. Schemat lokalizacji genu *VDR* w chromosomie 12 (12q13.11)

(na podstawie Genetic Home Reference, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VDR>)

Po raz pierwszy został sklonowany i ekspresjonowany przez Baker'a i współpracowników w 1988 roku [159]. Gen *VDR* zawiera 11 eksonów i składa się z około 75 kilo par zasad (kpz) [160]. Niekodujący 5-końcowy koniec genu *VDR* zawiera eksony 1A, 1B i 1C, podczas gdy jego produkt jest kodowany przez 8 dodatkowych eksonów (2-9). W wyniku zróżnicowanego splicingu eksonów 1B i 1C wytwarzane są trzy unikalne izoformy mRNA. Sekwencja DNA przed egzonem 1A jest bogata w GC i nie zawiera sekwencji TATA. Zlokalizowano również kilka potencjalnych miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1 (*specific protein 1*) i innych aktywatorów. Eksony 2 i 3 genu *VDR* kodują palce cynkowe i biorą udział w wiązaniu DNA, eksony 4, 5 i większość eksonu 6 tworzą region zawiasowy, natomiast eksony 7, 8 i 9 uczestniczą w wiązaniu z witaminą D [161].



Rycina 2. Schemat organizacji genu receptora witaminy D (VDR) na podstawie Morand G.B i wsp. [162]

Strzałki wskazują lokalizację polimorfizmów, których nazwy pochodzą od enzymów restrykcyjnych: FokI - polimorfizm zamiany cytozyny na tyminę (C/T) w eksonie 2, BsmI - polimorfizm zamiany guaniny na adeninę (G/A) w intronie 8, ApaI - polimorfizm zamiany tyminy na guaninę (T/G) w intronie 8, TaqI - polimorfizm zamiany tyminy na cytozynę (T/C) w eksonie 9.

1.5.2 Polimorfizmy genu receptora witaminy D (VDR)

Polimorfizm (gr. *polymorphos* – wielokształtny) jest to jednocześnie występowanie w populacji genomów zmienności allelicznej tj. różnych odmian tego samego genu (allele warunkujące różne fenotypy lub różny obraz fragmentów restrykcyjnych DNA). Podstawowym kryterium zakwalifikowania danej zmiany jako polimorfizmu jest występowanie w populacji z częstością wynoszącą powyżej 1%, w przeciwnym wypadku zmianę definiuje się jako mutację. Najczęstszymi typami polimorfizmów są : polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP), delecja-utrata/insercja-D/I (ang. *deletion/insertio*), zmienna liczba powtórzeń tandemowych (ang. *variable number of tandem repeats*, VNTR).

Nazewnictwo polimorfizmów genu witaminy D nie jest ujednolicone. W literaturze spotyka się zarówno nazwy systematyczne, jak i nazwy pochodzące od enzymów restrykcyjnych służących do wykrywania danego polimorfizmu, powodowanej przez polimorfizm substytucji aminokwasów, lokalizacji polimorfizmu względem miejsca startu

transkrypcji. W niniejszej pracy w odniesieniu do polimorfizmów analizowanych za pomocą enzymów restrykcyjnych stosowano nazwy pochodzące od odpowiednich enzymów (np. polimorfizm G/A w intronie 8 genu VDR wykrywany enzymem BsmI - polimorfizm BsmI). Zestawienie polimorfizmów genu receptora witaminy D analizowanych w niniejszej rozprawie przedstawiono w tabeli 3. Lokalizację polimorfizmów genu *VDR* przedstawiono na rycinie 2.

Tabela 3. Zestawienie polimorfizmów genu receptora witaminy D (VDR) analizowanych w niniejszej rozprawie

Nazwa zwyczajowa polimorfizmu (enzym restrykcyjny), allele	Nazwa systematyczna polimorfizmu ¹	Numer db SNP ²	Rodzaj zmiany
FokI (F f)	c.2T>C	rs2228570	tranzycja T>C w pierwszym kodonie - produkt białkowy krótszy o trzy aminokwasy
BsmI (B b)	1025-49G>A	rs1544410	zmiana w intronie 8
ApaI (A a)	1024+289G>T	rs7975232	zmiana w intronie 8
TaqI (T t)	c.1056T>C	rs731236	zmiana w eksonie 9

¹ nazwy systematyczne zalecane przez Human Genome Variation Society (www.hgvs.org)

² numery z bazy polimorfizmów punktowych NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/pl)

A: adenina, C: cytozyna, G: guanozyna, T: tymina

W odniesieniu do analizowanego genu odkryto ponad 100 polimorfizmów umiejscowionych w promotorze, w okolicy eksonów 2-9 oraz w regionie 3' UTR, ale tylko w przypadku kilku z nich zaobserwowano efekt fenotypowy, który był związany głównie z regulacją poziomu ekspresji genu [163].

Wśród analizowanych polimorfizmów tylko polimorfizm FokI wpływa bezpośrednio na zmianę otrzymywanego produktu białkowego. FokI zlokalizowany jest w eksonie 2 genu *VDR*

w okolicy połączenia intronu 1 i eksonu 2 i jest rozpoznawany przez endonukleazę restrykcyjną *BseGI*. Dochodzi do tranzykcji T>C w pierwszym kodonie odpowiedzialnym za inicjację procesu translacji (ACG→ATG). Występowanie tyminy powoduje zanik miejsca AUG i skutkuje rozpoczęciem translacji trzy kodony dalej, skutkiem czego jest powstanie białka zbudowanego z 424 aminokwasów. W przypadku, gdy nie dojdzie do zamiany cytozyny na tyminę, kodon startu translacji pozostanie bez zmian i efektem procesu będzie powstanie białka zbudowanego z 427 aminokwasów [164]. W badaniach *in vitro* wykazano, że krótsze białko ma wyższą aktywność transkrypcyjną niż cząsteczka zbudowana z większej liczby aminokwasów [165, 166]. Polimorfizmy *BsmI* i *ApaI*, które zlokalizowane są w intronie 8 genu *VDR* nie prowadzą do zmiany produktu białkowego. Występujący w eksonie 9 polimorfizm *TaqI* polega na substytucji T>C, co w konsekwencji prowadzi do zmiany kodonu (ATC→ATT), ale nie prowadzi do zmiany aminokwasu (izoleucyna, Ile>Ile). Ze względu na wspomniany efekt polimorfizm ten nazwano cichym polimorfizmem genu *VDR* [160] .

1.5.3 Efekt biologiczny genu *VDR* i jego polimorfizmów

Gen *VDR* koduje receptor dla witaminy D. Polimorfizmy *VDR* wpływają na poziom transkrypcji genu oraz wydajność translacji przez co może dochodzić do powstania białka o zmienionej konformacji, co skutkuje zmianą jego funkcji i właściwości jako czynnika transkrypcyjnego, co może się objawiać np. zmiennym powinowactwem do ligandu. W badaniach przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat zwraca się uwagę na związek polimorfizmów *VDR* z gęstością mineralną kości, rozrostem przytarczyc, wzrostem podatności na infekcje oraz choroby autoimmunologiczne [167].

Pierwsze doniesienia o związku między polimorfizmami genu *VDR* i gęstością mineralną kości u 91 osób pochodzenia brytyjsko-australijskiego opublikował w 1992 roku zespół pod kierownictwem Morrisona [168]. Dało to początek kolejnym badaniom mającym na celu ustalenie genetycznego podłoża osteoporozy.

Wiele opublikowanych dotychczasowych opracowań podejmuje problem związku polimorfizmów *VDR* z obniżoną masą kostną u kobiet w wieku pomenopauzalnym. W zdecydowanej większości analiz allelem powiązaniem z występowaniem osteoporozy był allel f (polimorfizm *FokI*). W metaanalizę przeprowadzonej przez Mohammadi i współpracownicy zaobserwowano związek polimorfizmów *FokI* i *BsmI* z osteoporozą w ponad 50% analizowanych badań [169]. Badania wykonane na grupie kobiet pochodzenia azjatyckiego (Tajwanki i Koreanki) wykazały związek genotypu ff z niską BMD w odcinku lędźwiowym

kręgosłupa i w obrębie szyjki kości udowej [170]. Związek polimorfizmów genu *VDR* z masą kostną wykazano także na populacji meksykańskiej [171]. W badaniu 261 kobiet po menopauzie z rejonu Wielkopolski istotną zależność między wartościami gęstości mineralnej kości a polimorfizmem genu odnotowano tylko dla allelu T *TaqI* genu *VDR*, ponadto wykazano częstsze występowanie u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną i wyższym ryzykiem złamania genotypu aa, bb i TT dla odpowiednich polimorfizmów genu *VDR* [172]. W badaniu 514 mieszkanek Wielkopolski zaobserwowano efekt dawki haplotypu baT polimorfizmów *BsmI*, *ApaI* i *TaqI* genu *VDR* na BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa [173]. W metaanalizie przeprowadzonej przez Gonga i współpracowników, w której analizowano 75 artykułów i abstraktów wykazano związek między genotypem *VDR* a masą kostną zwłaszcza u kobiet przed menopauzą. Obserwacje te potwierdzono dla młodych Amerykanek pochodzenia meksykańskiego i Kanadyjek [174, 175].

W obszernej wieloośrodkowej (9 europejskich ośrodków) analizie prowadzonej przez Uitterlindena i współpracowników nie wykazano natomiast związku polimorfizmów *VDR* z gęstością masy kostnej bądź też z występowaniem złamań [176]. Podobnych obserwacji u japońskich kobiet dokonali także Morita z zespołem- odnotowano brak jednoznacznego związku pomiędzy występowaniem miejsc polimorficznych *ApaI*, *TaqI* i *FokI* genu *VDR* a gęstością mineralną kręgów lędźwiowych, kości udowej i dystalnej części przedramienia [177]. Liczba dostępnych danych dotyczących związku polimorfizmów genu *VDR* z masą kostną u pacjentów z chorobami zapalnymi jelit jest ograniczona. W badaniu Noble i współpracowników nie stwierdzono związku między genotypami *VDR* i osteoporozą bądź też osteopenią, a czynnikiem mającym największy wpływ na masę kostną u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit okazała się być masa ciała chorych i BMI [178]. W publikowanym badaniu polskim wykazano związek genotypów *VDR* z BMD kręgosłupa lędźwiowego u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego [179].

Warianty polimorfizmów genu *VDR* mogą być także związane z podatnością na choroby autoimmunologiczne. Ze względu na istotną rolę czynników immunologicznych w etiopatogenezie NChZJ szczególne zainteresowanie budzi podatność na nieswoiste choroby zapalne jelit w odniesieniu do genów zaangażowanych w procesy immunologiczne. Znaczenie receptora *VDR* w etiopatologii nieswoistych chorób zapalnych jelit wiąże się z polimorfizmem genu *VDR*. W metaanalizie Xue i współpracowników wykazano znaczny wzrost zachorowania na chorobę Leśniowskiego-Crohna wśród Europejczyków z allelem tt *TaqI* oraz ochronny wpływ allelu a *ApaI*. W populacji azjatyckiej obecność allelu tt *TaqI* oraz polimorfizmu *FokI*

wiązała się także ze zwiększoną podatnością na wrzodziejące zapalenie jelita grubego [180]. W pracy Wanga i wsp. nie wykazano związku między polimorfizmami *VDR* a występowaniem nieswoistych chorób zapalnych jelit, podkreślono natomiast wzrost ryzyka zachorowania na chorobę Leśniowskiego-Crohna u Azjatów, będących homozygotami *AA* *ApaI* i homozygotami *BB* oraz heterozygotami *Bb* *BsmI* [181].

2. Cel pracy i hipoteza badawcza

2.1 Cel pracy

Celem pracy była analiza związków między polimorfizmami genu VDR, stężeniem witaminy D w surowicy i gęstością mineralną kości u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Cel realizowano przez następujące cele szczegółowe:

- A) Ocena stopnia niedoboru witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i porównanie z grupą kontrolną.
- B) Ocena gęstości mineralnej kości u badanych chorych.
- C) Ocena masy ciała i jej związku z gęstością mineralną kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.
- D) Ocena związku masy ciała ze stężeniem witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.
- E) Poszukiwanie związku stężenia witaminy D z gęstością mineralną kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej.
- F) Ocena częstości występowania polimorfizmów genu receptora witaminy D u badanych chorych i w grupie kontrolnej.
- G) Poszukiwanie związku polimorfizmów genu VDR ze stężeniem witaminy D u badanych chorych i w grupie kontrolnej.
- H) Ocena związku polimorfizmów genu VDR z gęstością mineralną kości u badanych chorych i w grupie kontrolnej.
- I) Ocena gęstości mineralnej kości w homogenicznej pod względem polimorfizmów genu VDR grupie chorych i w grupie kontrolnej.
- J) Ocena przydatności przeprowadzonego badania w praktyce klinicznej.

2.2 Hipoteza badawcza

U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit występuje niedobór witaminy D oraz obniżona gęstość mineralna kości.

Istnieje związek między gęstością mineralną kości, stężeniem witaminy D a polimorfizmami genu receptora witaminy D (VDR).

3. Materiał i metody

3.1 Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Gastroenterologii, Chorób Metabolicznych, Wewnętrznych i Dietetyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Do grupy badanej włączono 172 chorych, w tym 85 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) i 87 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG), dodatkowo przebadano 39 zdrowych osób (grupa kontrolna – GK). Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej

	LC	WZJG	GK
n	85	87	39
Wiek (lata)	35,24 ± 12,12 ¹	39,40 ± 14,43	30,74 ± 8,6
Płeć			
Kobiety	41 (48,24%)	47 (54,02%)	20 (51,28%)
Mężczyźni	44 (51,76%)	40 (45,98%)	19 (48,72%)
Masa ciała (kg)	63,20 ± 13,86	68,63 ± 14,92	73,62 ± 13,65
Wzrost (cm)	171,39 ± 10,30	170,80 ± 9,74	172,69 ± 9,35
BMI (kg/m ²)	21,36 ± 3,62	23,43 ± 4,32	24,57 ± 3,45
Czas trwania choroby (lata)	6,48 ± 5,12	7,86 ± 7,38	nie dotyczy
Liczba zaostrzeń	6,41 ± 5,35	5,37 ± 6,12	nie dotyczy

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

¹ Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Kryterium włączenia do grupy badanej było rozpoznanie nieswoistej choroby zapalnej jelit w oparciu o badania endoskopowe, histopatologiczne i radiologiczne, wiek powyżej 18 r.ż., wyrażenie świadomej zgody na udział w badaniu. Wszyscy włączeni do badania pacjenci byli leczeni zgodnie ze standardami Polskiego Towarzystwa Gastroenterologicznego i ECCO (*European Crohn's and Colitis Organisation*) zależnie od sytuacji klinicznej. Kryterium wykluczenia stanowiły: wiek poniżej 18 r.ż., ciąża, współistnienie chorób mogących wpływać na gęstość mineralną kości (przewlekła choroba nerek, aktywna choroba nowotworowa, niewydolność wątroby, choroby tarczycy, reumatologiczne zapalenie stawów, przewlekła obturacyjna choroba płuc, celiakia), brak świadomej zgody na udział w badaniu.

Materiałem biologicznym, będącym punktem wyjścia do dalszych analiz, była krew obwodowa. Wraz z krwią pacjentów zgromadzono także niezbędne dane kliniczne, do których należą: waga, wzrost oraz wiek pacjenta przy badaniu densytometrycznym. Wykonano badania densytometryczne określając gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i w obrębie szyjki kości udowej. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na przeprowadzenie badań wykonanych w ramach niniejszej pracy. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 336/14. Uzyskany materiał genetyczny jest przechowywany w banku DNA Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

3.2 Analiza genetyczna

3.2.1 Wykaz stosowanych roztworów i odczynników

75% alkohol etylowy

96% alkohol etylowy

Roztwór bromku etydyny (5 mg/ml)

Roztwór GTC do izolacji DNA: 4 M izotiocyanian guanidyny, 25 mM cytrynian sodu, 0,5% sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptoetanol; pH 7,4

Mieszanina fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego w stosunku 25:24:1

Chloroform

Izopropanol

DMSO (dimetylosulfotlenek)

Marker wielkości *PCR 100 bp Low Ladder* (Sigma Aldrich)

Deoksynukleotydy (*dNTP Set*) (Sigma Aldrich)

3.2.2 Wykaz stosowanych buforów

Bufor TBE 10× stężony: 890 mM Tris, 890 mM H₃BO₃, 20 mM EDTA (pH 7,4-7,8)

Bufor do lizy: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA (pH 7,4)

Bufor do PCR (Sigma Aldrich) 10× stężony; 1× stężony: 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100

Bufor obciążający: 1x TBE, 15% fikor, 0,3% EDTA, 0,2% oranż G

Bufor B⁺ (Fermentas)

Bufor G⁺ (Fermentas)

Bufor R⁺ (Fermentas)

Bufor Y⁺ (Fermentas)

Bufor TaqI (Fermentas)

3.2.3 Izolacja genomowego DNA z krwi pełnej metodą z izotiocyanidem guanidyny (GTC)

W pierwszym etapie pobrano od pacjentów po 5 ml pełnej krwi obwodowej do probówki z EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, ang. *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*). Związek ten zapobiega pozaustrojowemu krzepnięciu krwi. DNA izolowano metodą z zastosowaniem izotiocyanianu guanidyny (GTC) przebiegającą w kilku podstawowych etapach, takich jak: liza leukocytów, odbiałczanie DNA oraz jego wytrącanie [182]. W efekcie uzyskano wysokocząsteczkowy DNA, pozbawiony białek oraz inhibitorów enzymów, które mogłyby utrudniać dalsze etapy pracy. Następnie do krwi obwodowej pobranej w wyżej wymieniony sposób dodano 25 ml buforu do lizy: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA (pH 7,4), a potem mieszano i inkubowano przez 30 minut na lodzie. Po inkubacji preparaty poddano piętnastominutowemu wirowaniu przy użyciu wirówki Sroval RT6000B, w temperaturze 4°C przy 2500 obr./min. W dalszej kolejności odrzucono supernatant, a powstały osad zawierający leukocyty zawieszono w 500 μl buforu do lizy, po czym wymieszano. Następnie dodano 2 ml GTC, ponownie mieszano i następnie inkubowano przez 15 min na lodzie. Etap odbiałczania przeprowadzono przez dodanie 2,5 ml mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (proporcja 25:24:1) o pH 8,0, i kolejno wirowano próby w 4°C przy 3000 obr./min przez 15 minut, a następnie zbierano supernatant, do którego dodawano 2,5 ml chloroformu. Ponownie wirowano 15 minut w temperaturze 4°C przy 3000 obr./min, następnie aby wytrącić DNA dodano 5 ml etanolu (-20°C). W dalszej kolejności zebrano powstały osad i przemyto go dwukrotnie 1ml 75% etanolu. Po wytrąceniu osad DNA rozpuszczano w 300 μl sterylnej wody. Stężenie DNA określano metodą pomiaru absorpcji światła UV (NanoDrop 2000 Spectrophotometer). Stężenie DNA doprowadzono do wartości 50 ng/ μl , stanowiących tzw. rozcieńczenia robocze, wykorzystywane w dalszych etapach.

3.2.4 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Do amplifikacji wybranych fragmentów DNA stosowano reakcję PCR (ang. *polymerase chain reaction*) prowadzoną w 20 μl mieszaniny zawierającej 4 μl roztworu genomowego DNA. W mieszaninie znajdowało się 200 ng genomowego DNA, 0,25 mM dNTP, po 7,5 pmola każdego startera, 0,5 jednostki termostabilnej polimerazy Taq (Sigma Aldrich) oraz buforu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl_2). Reakcja przebiegała w termocyklerze (Termocykler PTC-100 (MJ Research Inc.)). Etapy reakcji PCR obejmowały: denaturację wstępną, denaturację, przyłączanie starterów, wydłużanie starterów (elongację) i elongację końcową. Sekwencje nukleotydowe stosowanych starterów

przedstawiono w tabeli 5 natomiast warunki amplifikacji metodą PCR w tabeli 6. Ocenę wielkości produktu reakcji PCR prowadzono poprzez elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym.

Tabela 5. Sekwencje nukleotydowe stosowanych starterów.

Tabela przedstawia sekwencje starterów F – *forward* i R – *reverse*, wielkości uzyskiwanych produktów PCR, optymalną temperaturę przyłączania starterów (T_m) wraz z liczbą cykli reakcji

Polimorfizm	Wielkość produktu (pz)	Sekwencja starterów 5' - 3'		T_m (°C) i liczba cykli
ApaI i TaqI VDR	745	F	CAG AgC ATg gAC Agg gAg CAA	64 (35)
		R	gCA ACT CCT CAT ggC TgA ggT CTC *	
BsmI VDR	837	F	ggC AAC CAA gAC TAC AAg TAC C	55 (35)
		R	TCT TCT CAC CTC TAA CCA gCg **	
FokI VDR	267	F	AgC Tgg CCC Tgg CAC TgA CTC TgC TCT	60 (31)
		R	ATg gAA ACA CCT TgC TTC TTC TCC CTC ***	

Źródła literaturowe starterów:

*Francis i wsp., 1997 [183]

**Kalak, 2005 [184]

***Gross i wsp., 1996 [171]

Tabela 6. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów.

Polimorfizm	Denaturacja wstępna		Denaturacja		Przyłączanie starterów		Elongacja		Elongacja końcowa	
	Czas (min)	Temp. (°C)	Czas (s)	Temp. (°C)	Czas (s)	Temp. (°C)	Czas (s)	Temp. (°C)	Czas (min)	Temp. (°C)
ApaI i TaqI VDR	5	94	45	94	45	64	90	72	5	72
BsmI VDR	4	94	40	94	45	55	80	72	5	72
FokI VDR	4	94	30	94	30	60	60	72	5	72

3.2.5 Hydroliza produktów PCR enzymami restrykcyjnymi – analiza RFLP i elektroforeza w żelu agarozowym

Do genotypowania wszystkich analizowanych w niniejszej pracy polimorfizmów wykorzystano metodę RFLP - polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*). W tabeli 7 przedstawiono warunki hydrolizy, w jakich przebiegały reakcje dla badanych fragmentów, podano także skład mieszaniny reakcyjnej i wielkości powstających w wyniku działania enzymów produktów.

Tabela 7. Zestawienie warunków analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP).

Przedstawia warunki analizy RFLP dla badanych polimorfizmów, użyte enzymy restrykcyjne, skład mieszaniny reakcyjnej i wielkości powstających w wyniku działania enzymów produktów. Pierwsza wartość w ostatniej kolumnie tabeli oznacza pełnej wielkości produkt powstający w wyniku reakcji PCR, odpowiadający allelowi bez miejsca restrykcyjnego dla enzymu, pozostałe dwie wartości są częściami składowymi wartości pierwszej, powstającymi w wyniku hydrolizy fragmentu wyjściowego i odpowiadającymi allelowi z miejscem restrykcyjnym dla enzymu. W przypadku polimorfizmu *TaqI* genu *VDR* produkt reakcji PCR wynosi 745 pz, ale fragment ten posiada jedno stałe i jedno polimorficzne miejsce restrykcyjne dla enzymu *TaqI*, dlatego zawsze ulegnie on hydrolizie do minimum dwóch fragmentów (494 i 251 pz - allel z jednym stałym miejscem restrykcyjnym) lub trzech (293, 251, 201 pz – allel z dwoma miejscami restrykcyjnymi, stałym i polimorficznym, gdzie fragmenty 293 i 201 powstały w wyniku hydrolizy fragmentu 494 pz) lub czterech (494, 293, 251, 201 pz – odpowiadających jednemu allelowi ze stałym miejscem restrykcyjnym i drugiemu z dwoma miejscami: stałym i polimorficznym).

Polimorfizm	Restryktaza (10 U/μl)	Mieszanina reakcyjna dla jednej próbki (μl)					Temp. (°C)	Czas reakcji (godz.)	Wielkości produktów po hydrolizie (pz)
		Woda	Produkt PCR	Bufor 10x stężony		Enzym			
<i>TaqI VDR</i>	<i>TaqI</i>	4	3	<i>Taq</i>	0,8	0,2	65	6	494, 293, 251, 201
<i>ApaI VDR</i>	<i>Bsp120I</i>	4	3	B+	0,8	0,2	37	16	745, 528, 217
<i>BsmI VDR</i>	<i>Mva1269I</i>	4	3	R+	0,8	0,2	37	16	837, 648, 189
<i>FokI VDR</i>	<i>BseGI</i>	3	4	Y+	0,8	0,2	55	4	267, 197, 70

Produkty hydrolizy fragmentów DNA rozdzielono w 1,5% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny. Rozdział prowadzono przez 30 minut przy 100 V w 1x stężonym buforze TBE. Ocenę żeli po rozdziale przeprowadzono na transiluminatorze G-box.

3.3 Oznaczanie poziomu witaminy D

3.3.1 Pobieranie i przygotowanie materiału

Od pacjentów pobrano po 5 ml krwi obwodowej do próbek z EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, ang. *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*). Przed oznaczeniem odwirowano próbki.

3.3.2 Odczynniki – roztwory robocze

Statyw odczynnikowy (M, R1, R2) i odczynniki obróbki wstępnej (PT1 i PT2) oznakowane jako VITD-T.

PT1 – odczynnik 1 do wstępnego przygotowania próbki, 4 ml, Dithiothreitol 1 g/l, pH 5.5.

PT2 – odczynnik 2 do wstępnego przygotowania próbki, 4 ml, wodorotlenek sodu 55 g/l.

M – mikrocząsteczki opłaszczone streptawidyną 0,72 mg/ml, 6.5 ml.

R1 – białko wiążące witaminę D-BPRu, 9 ml; znakowane rutenem białko wiążące witaminę D (150 ug/l), bufor bis-tris propan 200 mmol/l, albumina ludzka 25 g/l, pH 7.5, konserwant.

R2 – znakowana biotyną 25-hydroksywitamina D, 8.5 ml; biotynylowana witamina D (25-OH) 14ug/l, bufor bis-tris propan 200 mmol/l, pH 6.8, konserwant.

3.3.3 Zasada pomiaru

U wszystkich pacjentów wykonano oznaczenie stężenia 25 OHD (marker zaopatrzenia organizmu w witaminę D) w surowicy metodą wiązania elektrochemiluminiscencyjnego przy użyciu testu i immunoanalizatora Cobas e 601 (Roche). Czulość funkcjonalną oznaczono na 4,01 ng/ml (współczynnik zmienności 18,5%).

Metoda oznaczenia – kompetycyjna.

1 inkubacja – uwolnienie związanej witaminy D (25-OH) od białka wiążącego witaminę D – inkubowano próbkę z odczynnikiem do wstępnego przygotowania próbki – PT1 i PT2.

2 inkubacja – utworzenie kompleksu witaminy D (25-OH) i znakowanego rutenem białka wiążącego witaminę D – inkubowano przygotowaną wstępnie próbkę z białkiem wiążącym witaminę D znakowanym rutenem.

3 inkubacja – dodano cząsteczki opłaszczone streptawidyną i witaminę D (25-OH) znakowaną biotyną, co spowodowało zajęcie białek wiążących niezwiązaną witaminę D znakowaną reutenem i wytworzenie związku złożonego z białek wiążących znakowaną reutenem witaminę

D i biotynylowanej witaminy D (25-OH), który to wiąże się z fazą stałą na skutek interakcji biotyny i streptawidyny.

Przeniesiono powstałą mieszaninę reakcyjną do komory pomiarowej, w której mikrocząsteczki przyciągane są do elektrody pomiarowej za pomocą magnesu. Napięcie przyłożone do elektrody indukuje reakcję elektrochemiluminescencji oraz emisję fotonu mierzoną za pomocą fotopowielacza. Następnie odczytano wyniki z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla immunoanalizatora Cobas e 601 (Roche) w oparciu o kalibrację dwupunktową oraz krzywą wzorcową zawartą w kodzie kreskowym odczynnika. Całkowity czas oznaczania wynosił 27 minut.

Zastosowane metody są zgodne z wytycznymi Dyrektywy Europejskiej 98/79/EC, Aneks II, Lista A.

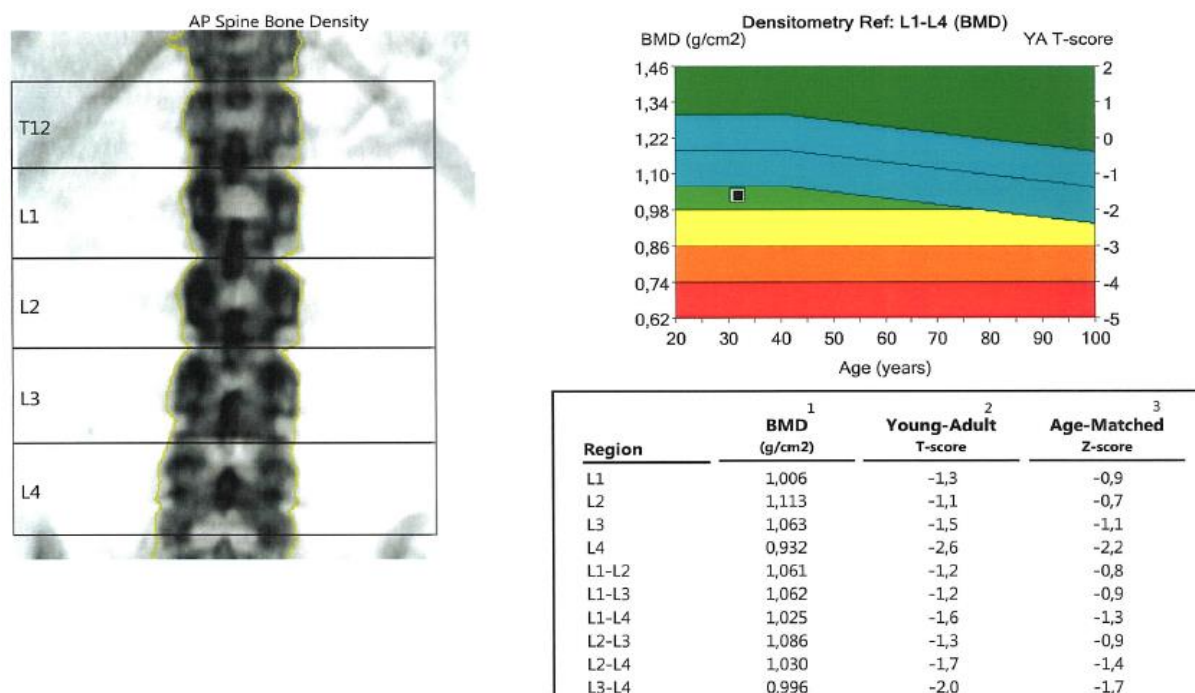
3.4 Densytometria kości metodą DEXA

Badania densytometryczne pacjentów zostały wykonane metodą DEXA (dwuenergetyczna absorpcjometria rentgenowska – ang. *dual energy X-ray absorptiometry*) przy użyciu aparatu DPX-Plus firmy Lunar. Metoda ta opiera się na jednoczesnym pomiarze absorpcji wysokoenergetycznego i niskoenergetycznego promieniowania rentgenowskiego. Przy zmianie energii promieniowania, w badanej kości (w przeciwieństwie do tkanki miękkiej) dochodzi do zmiany stopnia absorpcji dawki, co daje możliwość obliczenia części dawki absorbowanej przez kość. Następnie po porównaniu wartości absorpcji z absorpcją klina aluminiowego możliwe jest obliczenie bezwzględnej masy mineralnej w jednostkach masy (gram [g]). Podzielenie otrzymanego wyniku przez powierzchnię pomiaru daje gęstość mineralną kości (BMD – ang. *bone mineral density*) wyrażoną w g/cm^2 [185]. Pomiaru BMD dokonano u wszystkich badanych w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L) i w obrębie bliższego końca szyjki kości udowej lewej (SKU). Aparat densytometryczny dokumentował wyniki pomiaru w formie wydruku komputerowego. Na wydruku zawarte zostały dane pacjenta, wyniki pomiarów w poszczególnych obszarach kręgosłupa i szyjki kości udowej, wykres zakresu normy z zaznaczoną wartością pomiaru danego pacjenta i obraz miejsca pomiaru [186]. W trakcie analizy komputerowej uzyskane wyniki podano także w odchyleniach standardowych (SD):

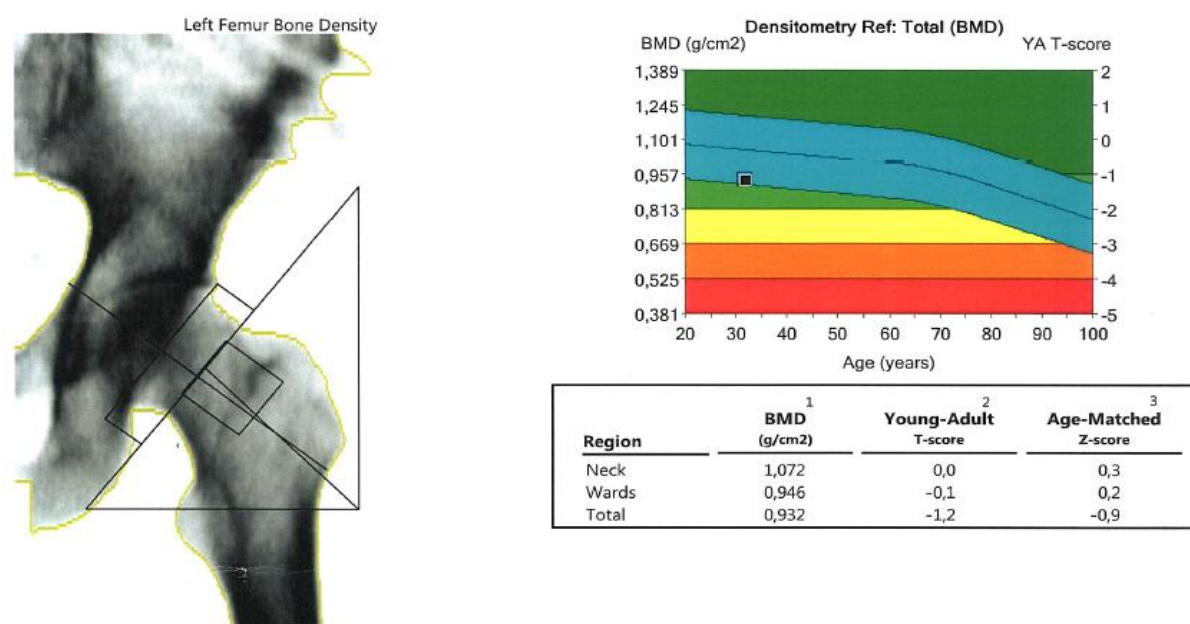
- Z-score – wynik badania jako odchylenie od średniej w grupie kontrolnej w tym samym wieku podzielone przez odchylenie standardowe tej średniej

- T-score – odniesienie otrzymanych wartości do wielkości masy szczytowej w grupie kontrolnej [187].

Przykładowe wyniki pomiarów densytometrycznych w obrębie kręgosłupa lędźwiowego i bliższego końca szyjki kości udowej przedstawiono odpowiednio na rycinie 3 i rycinie 4.



Rycina 3. Wynik badania densytometrycznego kręgosłupa lędźwiowego (Pracownia Densytometrii, Poradnia Leczenia Osteoporozy, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego, Poznań).



Rycina 4. Wynik badania densytometrycznego bliższego końca kości udowej (Pracownia Densytometrii, Poradnia Leczenia Osteoporozy, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego, Poznań).

Wszystkie pomiary densytometryczne przeprowadzone w ramach prezentowanego problemu badawczego zostały wykonane przez tego samego technika.

3.5 Analiza bioinformatyczna

3.5.1 Analiza zgodności z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Przeprowadzono analizę zgodności rozkładu genotypów z rozkładem w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Analizę wykonano za pomocą kalkulatora na stronie <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

3.5.2 Analiza statystyczna wyników

W pierwszej kolejności dokonano oceny normalności rozkładów i homogeniczności wariancji zmiennych w badanych grupach (ocena normalności: test W - Shapiro-Wilka, ocena homogeniczności: test Levene'a). Ze względu na częste niespełnianie dwóch albo przynajmniej jednego z warunków a także nierównoliczne grupy, w celu porównań międzygrupowych zastosowano nieparametryczny test H - Kruskala-Wallisa. W przypadku uzyskania istotnego statystycznie ogólnego zróżnicowania międzygrupowego, porównań wielokrotnych dokonano testem Dunn'a. Celem oceny związku między zmiennymi jakościowymi (badane grupy x grupy o różnych allelach) zastosowano test Chi-kwadrat oraz iloraz szans (odds ratio, OR). Do oceny związku między zmiennymi ilościowymi zastosowano współczynnik korelacji r Pearsona lub r Spearmana (w zależności od spełnienia warunku normalności rozkładu). Wszystkie analizy wykonane zostały za pomocą programu STATISTICA 12.0 (StatSoft) oraz kalkulatora na stronie <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Wyniki, dla których poziom istotności p był mniejszy lub równy 0,05, uznane zostały za istotne statystycznie.

4. Wyniki

4.1 Porównanie grupy badanej i grupy kontrolnej pod względem analizowanych parametrów

Porównanie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej pod względem analizowanych parametrów przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Porównanie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej pod względem analizowanych parametrów.

	LC	WZJG	GK	<i>p</i>
n	85	87	39	
Wiek (lata)	35,24 ± 12,12 ¹	39,40 ± 14,43	30,74 ± 8,6	p=0,0048 ***p=0,0038
Masa ciała (kg)	63,20 ± 13,86	68,63 ± 14,92	73,62 ± 13,65	p=0,0013 **p=0,0013
Wzrost (cm)	171,39 ± 10,30	170,80 ± 9,74	172,69 ± 9,35	p=0,6998 (<i>ns</i>)
BMI (kg/m ²)	21,36 ± 3,62	23,43 ± 4,32	24,57 ± 3,45	p=0,00001 *p=0,0028 **p=0,00003
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,12 ± 0,18	1,16 ± 0,14	1,22 ± 0,08	p=0,0150 **p=0,0009 ***p=0,0366
L2-L4 T score	-0,82 ± 1,45	-0,46 ± 1,15	0,09 ± 0,70	p=0,0003 **p=0,0002 ***p=0,0203
L2-L4 Z score	-0,41 ± 1,32	-0,18 ± 1,19	0,09 ± 0,66	p=0,0450 **p=0,0413
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 ± 0,18	0,98 ± 0,15	1,07 ± 0,16	p=0,0005 **p=0,0003 ***p=0,0155
SKU T score	-0,65 ± 1,28	-0,31 ± 1,14	0,41 ± 1,03	p=0,00001 **p=0,00001 ***p=0,0039
SKU Z score	-0,27 ± 1,08	0,06 ± 1,04	0,38 ± 0,99	p=0,0046 **p=0,0044
25 OHD	21,43 ± 12,32	22,06 ± 9,27	21,56 ± 9,11	p=0,7657 (<i>ns</i>)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, SKU: szyjka kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (*bone mineral density*), BMI: (*body mass index*)
ns: non-significant

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Liczba gwiazdek oznacza grupy zawarte w porównaniu, następująco:

* LC vs WZJG, ** LC vs grupa kontrolna, *** WZJG vs grupa kontrolna

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy osobami z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem wieku ($p < 0,01$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że osoby z WZJG były starsze w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Pacjenci z badanych grup istotnie statystycznie różnili się masą ciała ($p < 0,01$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z grupy kontrolnej miały istotnie wyższą masę ciała od chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna ($p < 0,01$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy osobami z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem BMI (body mass index) ($p < 0,001$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała istotne statystycznie różnice między pacjentami z chorobą Leśniowskiego-Crohna a pacjentami z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego ($p < 0,01$) oraz między pacjentami z chorobą Leśniowskiego-Crohna a osobami z grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Osoby z badanych grup istotnie statystycznie różniły się gęstością mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z grupy kontrolnej miały istotnie wyższą gęstość mineralną kości (BMD) w porównaniu do pacjentów z grupy LC ($p < 0,001$) oraz do pacjentów z WZJG ($p < 0,05$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy osobami z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score L2-L4 ($p < 0,001$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że osoby z LC istotnie statystycznie różniły się od grupy kontrolnej ($p < 0,001$) oraz że osoby z WZJG różniły się od grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Osoby z badanych grup istotnie statystycznie różniły się Z score L2-L4 ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z LC różnią się istotnie od osób z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy osobami z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU) ($p < 0,001$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że osoby z LC miały niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej od osób z grupy kontrolnej ($p < 0,001$) oraz, że osoby z WZJG miały niższą gęstość mineralną kości od osób z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Osoby z badanych grup istotnie statystycznie różniły się T score SKU ($p < 0,001$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z LC różnią się istotnie od osób z grupy kontrolnej ($p < 0,001$) oraz że osoby z WZJG różnią się istotnie od osób z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy osobami z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem Z score SKU ($p < 0,01$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała istotne różnice między pacjentami z LC a grupą kontrolną ($p < 0,01$).

Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu witaminy D między osobami z poszczególnych grup badanych.

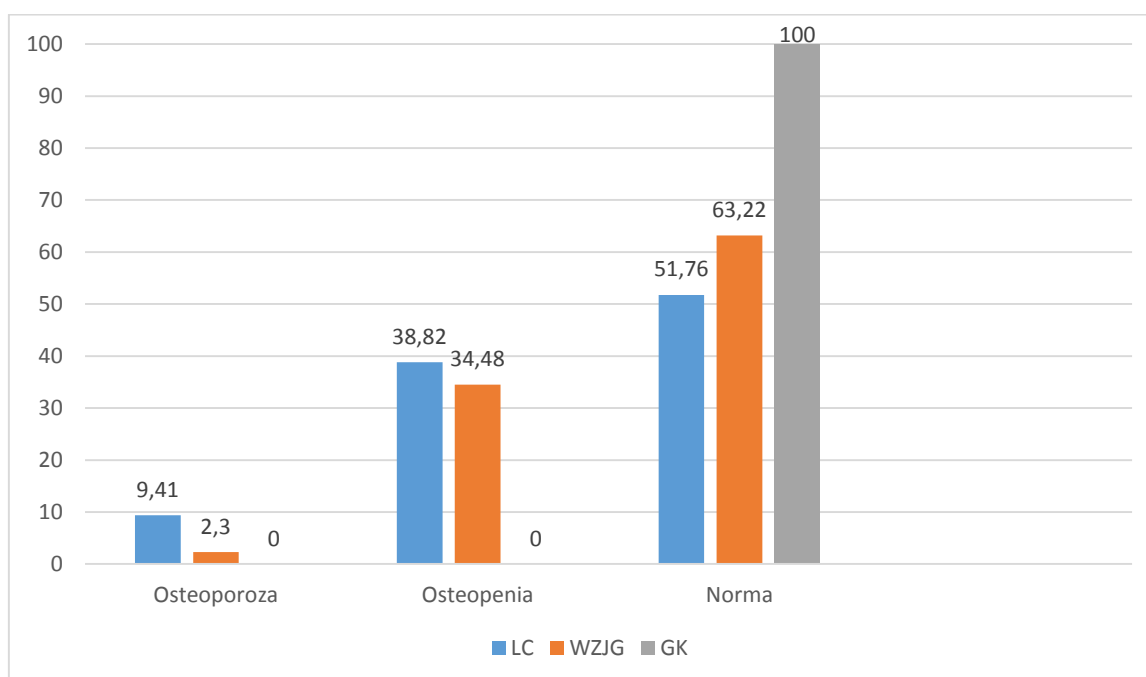
4.2 Osteoporoza i osteopenia u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego.

Odsetek pacjentów z osteoporozą, osteopenią i prawidłową gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2-L4) u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli numer 9 i na rycinie numer 5.

Tabela 9. Gęstość mineralna kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa u pacjentów z badanych grup.

Kategoria	Osteoporoza	Osteopenia	Norma
Grupa	n (%)	n (%)	n (%)
LC	8 (9,41%)	33 (38,82%)	44 (51,76%)
WZJG	2 (2,30%)	30 (34,48%)	55 (63,22%)
GK	0 (0,0%)	0 (0,0%)	39 (100%)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna



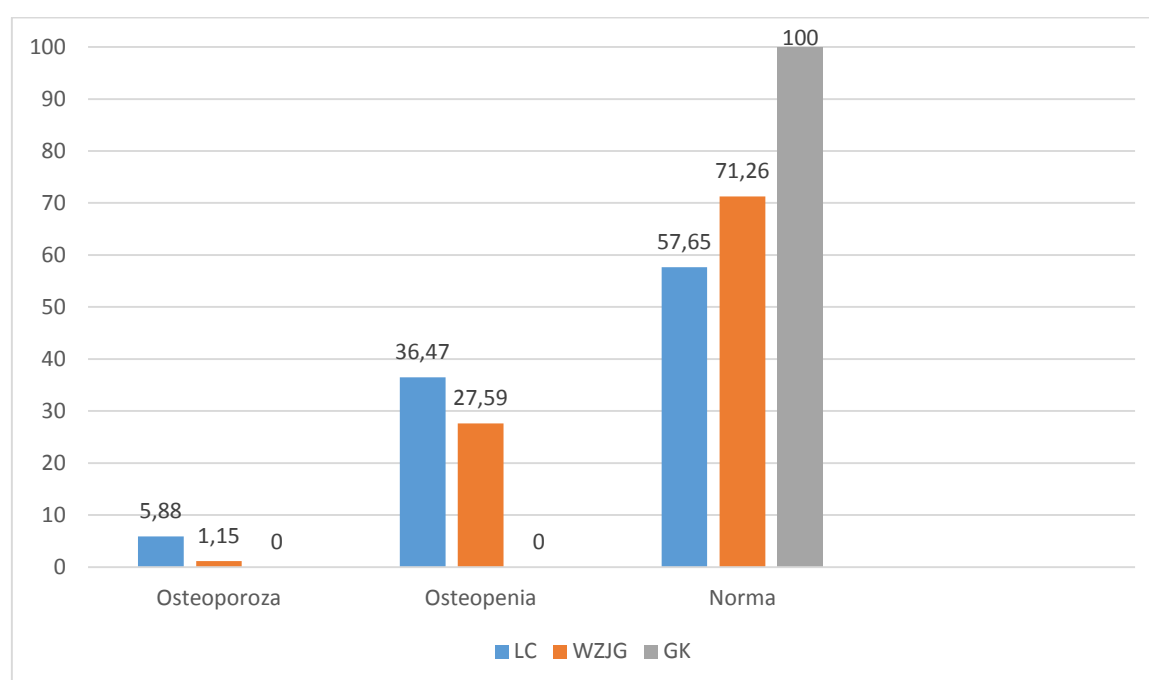
Rycina 5. Gęstość mineralna kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2-L4) u pacjentów z badanych grup (rozkład procentowy). (LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna)

Odsetek pacjentów z osteoporozą, osteopenią i prawidłową gęstością mineralną kości szyjki kości udowej (SKU) u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli numer 10 i na rycinie numer 6.

Tabela 10. Gęstość mineralna kości w obrębie szyjki kości udowej u pacjentów z badanych grup.

Kategoria	Osteoporoza	Osteopenia	Norma
Grupa	n (%)	n (%)	n (%)
LC	5 (5,88%)	31 (36,47%)	49 (57,65%)
WZJG	1 (1,15%)	24 (27,59%)	62 (71,26%)
GK	0 (0%)	0 (0%)	39 (100%)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna



Rycina 6. Gęstość mineralna kości w szyjce kości udowej (SKU) u pacjentów z badanych grup (rozkład procentowy). (LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna)

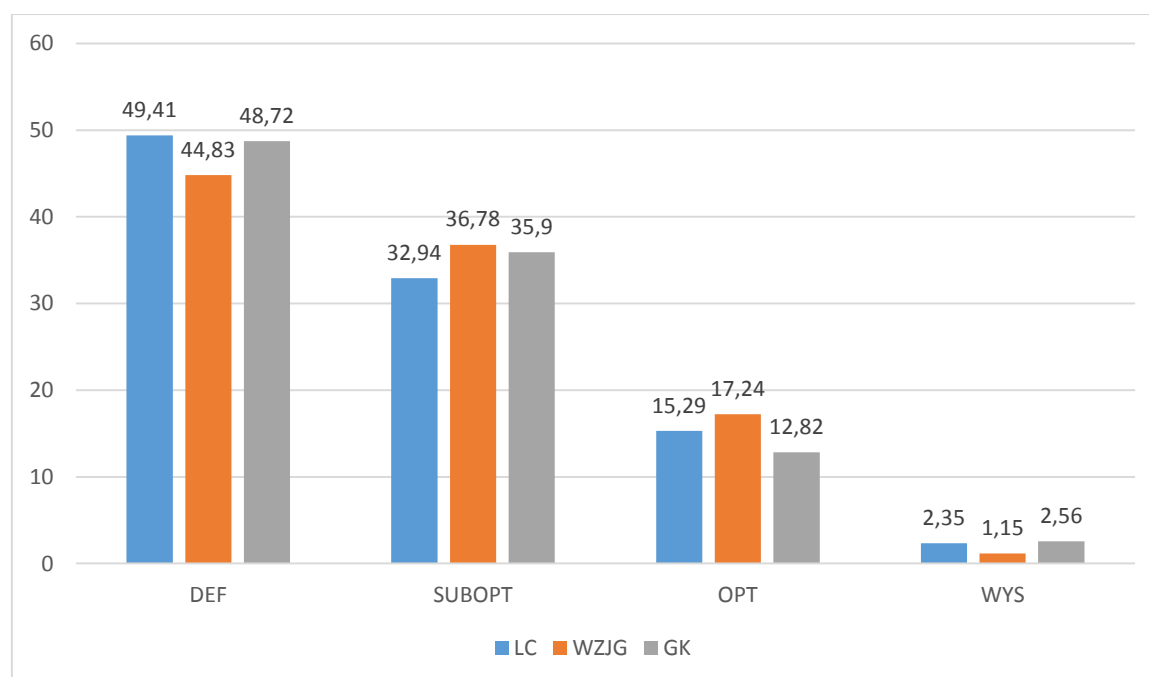
4.3 Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D.

Strukturę stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli numer 11 i na rycinie numer 7.

Tabela 11. Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D w badanych grupach.

Grupa	LC	WZJG	GK
Kategoria	n (%)	n (%)	n (%)
Deficyt	42 (49,41%)	39 (44,83%)	19 (48,72%)
Stężenie suboptymalne	28 (32,94%)	32 (36,78%)	14 (35,90%)
Stężenie optymalne	13 (15,29%)	15 (17,24%)	5 (12,82%)
Stężenie wysokie	2 (2,35%)	1 (1,15%)	1 (2,56%)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna



Rycina 7. Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D w badanych grupach (rozkład procentowy). (LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, DEF: deficyt, SUBOPT: poziom suboptymalny, OPT: poziom optymalny, WYS: poziom wysoki)

4.4 Związki między stężeniem witaminy D a cechami morfologicznymi i gęstością mineralną kości w badanych grupach.

W tabeli numer 12 przedstawiono korelacje między stężeniem witaminy D a wiekiem, wzrostem, masą ciała, BMI oraz gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i w szyjce kości udowej dla pacjentów z badanymi grupami oraz dla grupy kontrolnej.

Tabela 12. Stężenie witaminy D a cechy morfologiczne i gęstość mineralna kości w grupach badanych.

Grupa	LC	WZJG	GK
Parametr	25OHD (ng/ml)		
Wiek (lata)	r=-0,16 p=0,1485	r=0,18 p=0,0876	r=-0,05 p=0,7555
Masa ciała (kg)	r=0,11 p=0,3315	r=-0,14 p=0,2002	r=-0,22 p=0,1825
Wzrost (cm)	r=0,04 p=0,7222	r=-0,19 p=0,0734	r=-0,16 p=0,3375
BMI (kg/m ²)	r=0,13 p=0,2217	r=-0,02 p=0,8338	r=-0,12 p=0,4569
L2-L4 BMD (g/cm ²)	r=0,03 p=0,7593	r=-0,01 p=0,8906	r=-0,21 p=0,1956
L2-L4 T score	r=0,01 p=0,941	r=-0,03 p=0,7708	r=-0,21 p=0,1989
L2-L4 Z score	r=-0,01 p=0,9635	r=0,05 p=0,6249	r=-0,12 p=0,4509
SKU BMD (g/cm ²)	r=0,06 p=0,5774	r=-0,15 p=0,1774	r=-0,27 p=0,1002
SKU T score	r=0,08 p=0,4737	r=-0,13 p=0,2288	r=-0,20 p=0,2296
SKU Z score	r=0,01 p=0,9481	r=-0,07 p=0,5439	r=-0,16 p=0,3455

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, SKU: szyjka kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (*bone mineral density*), BMI: (*body mass index*)
r – współczynnik korelacji
ns – non significant

Żadna z analizowanych korelacji nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05.

4.5 Związki między gęstością mineralną kości a danymi morfologicznymi w badanych grupach.

W tabeli numer 13 przedstawiono korelacje między gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, szyjki kości udowej a wiekiem, wzrostem, masą ciała i BMI w badanych grupach pacjentów i w grupie kontrolnej.

Tabela 13. Gęstość mineralna kości a cechy morfologiczne w grupach badanych.

Grupa	LC	WZJG	GK
Parametr	L2-L4 BMD (g/cm ²)		
Wiek (lata)	r=-0,08 p=0,4431	r=-0,17 p=0,1078	r=0,40 p=0,0115
Masa ciała (kg)	r=0,47 p<0,001	r=0,10 p=0,3800	r=0,49 p=0,0010
Wzrost (cm)	r=0,40 p<0,001	r=0,20 p=0,0626	r=0,25 p=0,1230
BMI (kg/m ²)	r=0,29 p=0,0071	r=0,03 p=0,7850	r=0,41 p=0,0097
	L2-L4 T score		
Wiek (lata)	r=-0,03 p=0,8094	r=-0,17 p=0,1144	r=0,33 p=0,0395
Masa ciała (kg)	r=0,44 p<0,001	r=0,05 p=0,6730	r=0,32 p=0,0500
Wzrost (cm)	r=0,35 p=0,0010	r=0,11 p=0,3160	r=0,19 p=0,2540
BMI (kg/m ²)	r=0,29 p=0,0070	r=0,03 p=0,8072	r=0,29 p=0,0747
	L2-L4 Z score		
Wiek (lata)	r=0,11 p=0,3336	r=-0,01 p=0,9333	r=0,32 p=0,0469
Masa ciała (kg)	r=0,15 p=0,1790	r=-0,25 p=0,0180	r=-0,10 p=0,5390

Wzrost (cm)	r=0,15 p=0,1670	r=-0,21 p=0,0507	r=-0,07 p=0,6800
BMI (kg/m2)	r=0,07 p=0,5102	r=-0,15 p=0,1668	r=0,00 p=0,9932
	SKU BMD (g/cm2)		
Wiek (lata)	r=-0,28 p=0,0084	r=-0,33 p=0,0020	r=-0,02 p=8846
Masa ciała (kg)	r=0,59 p<0,001	r=0,33 p=0,0020	r=0,45 p=0,0044
Wzrost (cm)	r=0,63 p<0,001	r=0,47 p<0,001	r=0,49 p=0,0016
BMI (kg/m2)	r=0,33 p=0,0022	r=0,10 p=0,3660	r=0,22 p=0,1797
	SKU T score		
Wiek (lata)	r=-0,25 p=0,0195	r=-0,38 p<0,001	r=0,04 p=0,8202
Masa ciała (kg)	r=0,50 p<0,001	r=0,16 p=0,1490	r=0,24 p=0,1440
Wzrost (cm)	r=0,51 p<0,001	r=0,29 p=0,0060	r=0,30 p=0,0676
BMI (kg/m2)	r=0,31 p=0,0040	r=0,00 p=0,9740	r=0,10 p=0,5345
	SKU Z score		
Wiek (lata)	r=-0,05 p=0,6577	r=-0,11 p=0,3069	r=0,17 p=0,3036
Masa ciała (kg)	r=0,32 p=0,0020	r=0,03 p=0,7758	r=0,04 p=0,8271
Wzrost (cm)	r=0,33 p=0,0020	r=0,12 p=0,2738	r=0,08 p=0,6266
BMI (kg/m2)	r=0,18 p=0,1004	r=-0,01 p=0,8954	r=-0,01 p=0,9337

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, SKU: szyjka kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (*bone mineral density*), BMI: (*body mass index*)
r – współczynnik korelacji
ns – non significant

W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowano istotną statystycznie pozytywną korelację między gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (BMD L2-L4) a masą ciała, wzrostem i BMI (odpowiednio: $r=0,47$, $p<0,001$; $r=0,40$, $p<0,001$; $r=0,29$, $p<0,01$). W grupie kontrolnej odnotowano istotną pozytywną korelację między gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (BMD L2-L4) a wiekiem, masą ciała i BMI (odpowiednio: $r=0,40$, $p<0,05$; $r=0,49$, $p<0,01$; $r=0,41$, $p<0,01$).

W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowano istotną statystycznie dodatnią korelację między T score L2-L4 a masą ciała, wzrostem i BMI (odpowiednio: $r=0,44$, $p<0,001$; $r=0,35$, $p<0,01$; $r=0,29$, $p<0,01$). W grupie kontrolnej odnotowano istotną korelację dodatnią między T score L2-L4 a wiekiem ($r=0,33$, $p<0,05$) i masą ciała ($r=0,32$, $p<0,05$).

W grupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego odnotowano istotną statystycznie ujemną korelację między Z score L2-L4 a masą ciała ($r=-0,25$, $p<0,05$). W grupie kontrolnej odnotowano istotną dodatnią korelację między Z score L2-L4 a wiekiem ($r=0,32$, $p<0,05$).

W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowano istotną statystycznie korelację między gęstością mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD) a wiekiem, masą ciała, wzrostem i BMI (odpowiednio: $r=-0,28$, $p<0,01$; $r=0,59$, $p<0,001$; $r=0,63$, $p<0,001$; $r=0,33$, $p<0,01$). W grupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego odnotowano istotną statystycznie korelację między gęstością mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD) a wiekiem, masą ciała, wzrostem (odpowiednio: $r=-0,33$, $p<0,01$; $r=0,33$, $p<0,01$; $r=0,47$, $p<0,001$). W grupie kontrolnej odnotowano istotną dodatnią korelację między gęstością mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD) a masą ciała ($r=0,45$, $p<0,01$) i wzrostem ($r=0,49$, $p<0,01$).

W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowano istotną statystycznie korelację między SKU T score a wiekiem, masą ciała, wzrostem i BMI (odpowiednio: $r=-0,25$, $p<0,05$; $r=0,50$, $p<0,001$; $r=0,51$, $p<0,001$; $r=0,31$, $p<0,01$). W grupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego odnotowano istotną statystycznie korelację między SKU T score a wiekiem ($r=-0,38$, $p<0,001$) i wzrostem ($r=0,29$, $p<0,01$).

W grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna odnotowano istotną statystycznie dodatnią korelację między SKU Z score a masą ciała ($r=0,32$, $p<0,01$) i wzrostem ($r=0,33$, $p<0,01$).

4.6 Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

Tabela 14 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

Grupa	Genotypy (%)			Allele (%)	
	FF	Ff	ff	F	f
NChZJ n=172	63 (36.6%)	82 (47.7%)	27 (15.7%)	208 (60.5%)	136 (39.5%)
WZJG (n=87)	31 (35.6%)	38 (43.7%)	18 (20.7%)	100 (57.5%)	74 (42.5%)
LC (n=85)	32 (37.7%)	44 (51.8%)	9 (10.6%)	108 (63.5%)	62 (36.5%)
GK (n=39)	11 (28.2%)	22 (56.4%)	6 (15.4%)	44 (56.4%)	34 (43.6%)

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

Tabela 14 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) między badanymi grupami.

	[FF+Ff] vs [ff]	[FF] vs [Ff+ff]	[FF] vs [ff]	[F] vs [f]	[f] vs [F]
NChZJ vs GK OR, 95% CI p	OR = 1.02 [0.39-2.68] p = 0.961	OR = 1.47 [0.69-3.16] p = 0.320	OR = 1.27 [0.43-3.79] p = 0.665	OR = 1.18 [0.72-1.94] p = 0.510	OR = 0.85 [0.52-1.39] p = 0.510
WZJG vs GK OR, 95% CI p	OR = 1.44 [0.52-3.95] p = 0.483	OR = 1.41 [0.62-3.21] p = 0.414	OR = 0.939 [0.30-2.97] p = 0.915	OR = 1.044 [0.61-1.79] p = 0.333	OR = 0.96 [0.56-1.64] p = 0.333
LC vs GK OR, 95% CI p	OR = 0.65 [0.21-1.98] p = 0.447	OR = 1.54 [0.67-3.50] p = 0.305	OR = 1.94 [0.56-6.70] p = 0.291	OR = 1.35 [0.78-2.32] p = 0.285	OR = 0.74 [0.43-1.28] p = 0.285
LC vs WZJG OR, 95% CI p	OR = 2.20 [0.93-5.23] p = 0.069	OR = 0.92 [0.49-1.71] p = 0.784	OR = 0.48 [0.19-1.24] p = 0.127	OR = 0.78 [0.50-1.20] p = 0.251	OR = 1.29 [0.84-1.99] p = 0.251

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

OR: iloraz szans (odds ratio), CI: przedział ufności (confidence interval)

W *locus* FokI w genie *VDR* nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości alleli i rozkładzie genotypów pomiędzy badanymi grupami. Jednak zauważono, że u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna allel F występował z nieznacznie wyższą częstością niż w grupie kontrolnej i pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (63.5% vs 56.4% i 57.5% odpowiednio; OR = 1.35, CI = [0.78-2.32], p = 0.285). Podobnie, wśród chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna częściej wykrywano homozygoty FF (37.7% vs 28.2%),

natomiast genotyp ff występował rzadziej niż w grupie kontrolnej (10.6% vs 15.4%). Obserwacje te nie spełniały jednak przyjętej granicy istotności statystycznej.

4.7 Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

Tabela 15 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

	Genotypy (%)			Allele (%)	
	BB	Bb	bb	B	b
NChZJ n=172	36 (20.9%)	79 (45.9%)	57 (33.1%)	151 (43.9%)	193 (56.1%)
WZJG (n=87)	22 (25.3%)	34 (39.1%)	31 (35.6%)	78 (44.8%)	96 (55.2%)
LC (n=85)	14 (16.5%)	45 (52.9%)	26 (30.6%)	73 (42.9%)	97 (57.1%)
GK (n=39)	3 (7.7%)	23 (59.0%)	13 (33.3%)	29 (37.2%)	49 (62.8%)

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

Tabela 15 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) między badanymi grupami.

	[BB+Bb] vs [bb]	[BB] vs [Bb+bb]	[BB] vs [bb]	[B] vs [b]	[b] vs [B]
NChZJ vs GK OR, 95% CI P	OR = 0.99 [0.47-2.07] p = 0.981	OR = 3.18 [0.93-10.91] p = 0.055	OR = 2.74 [0.93-10.28] p = 0.124	OR = 1.32 [0.80-2.19]	OR = 0.76 [0.46-1.26]
				p = 0.280	
WZJG vs GK OR, 95% CI P	OR = 1.11 [0.50-2.46] p = 0.802	OR = 4.06 [1.14-14.51] p = 0.022	OR = 3.08 [0.78-12.09] p = 0.097	OR = 1.37 [0.79-2.37]	OR = 0.73 [0.42-1.26]
				p = 0.256	
LC vs GK OR, 95% CI P	OR = 0.88 [0.39-1.98] p = 0.760	OR = 2.37 [0.64-8.78] p = 0.187	OR = 2.33 [0.57-9.59] p = 0.232	OR = 1.27 [0.73-2.21]	OR = 0.79 [0.45-1.36]
				p = 0.392	
LC vs WZJG OR, 95% CI P	OR = 1.26 [0.67-2.37] p = 0.482	OR = 1.71 [0.81-3.63] p = 0.155	OR = 1.32 [0.56-3.08] p = 0.523	OR = 1.08 [0.71-1.65]	OR = 0.93 [0.61-1.42]
				p = 0.724	

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

OR: iloraz szans (odds ratio), CI: przedział ufności (confidence interval)

Allel B występował z wyższą częstością u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit niż w grupie kontrolnej (43.9% vs 37.2%), jednak nie było to statystycznie istotne (OR=1.32, p=0.280). Analizując rozkład genotypów w badanych grupach

zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypu BB u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit niż w grupie kontrolnej (20.9% vs 7.7%), przy czym u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego występował on najczęściej (25.3%). Genotyp BB występował 3 razy częściej niż genotypy bb + Bb (OR = 3.18) jednak było to na granicy istotności statystycznej ($p=0.055$). Rozważając genotyp BB w układzie recesywnym (gdzie allelem ryzyka był allel B) zaobserwowano że występował on istotnie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej (OR=4.06, CI=[1.14-14.51], $p=0.022$).

4.8 Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

Tabela 16 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

	Genotypy (%)			Allele (%)	
	AA	Aa	aa	A	a
NChZJ n=172	56 (32.6%)	80 (46.5%)	36 (20.9%)	192 (55.8%)	152 (44.2%)
WZJG (n=87)	31 (35.6%)	39 (44.8%)	17 (19.5%)	101 (58.1%)	73 (41.9%)
LC (n=85)	25 (29.4%)	41 (48.2%)	19 (22.4%)	91 (53.5%)	79 (46.5%)
GK (n=39)	15 (38.5%)	14 (35.9%)	10 (25.6%)	44 (56.4%)	34 (43.6%)

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

Tabela 16 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) między badanymi grupami.

	[AA+Aa] vs [aa]	[AA] vs [Aa+aa]	[AA] vs [aa]	[A] vs [a]	[a] vs [A]
NChZJ vs GK OR, 95% CI P	OR = 0.77 [0.34-1.72] p = 0.520	OR = 0.77 [0.38-1.59] p = 0.481	OR = 0.96 [0.39-2.38] p = 0.937	OR = 0.98 [0.60-1.60]	OR = 1.03 [0.62-1.68]
				p = 0.924	
WZJG vs GK OR, 95% CI P	OR = 0.70 [0.29-1.72] p = 0.440	OR = 0.89 [0.41-1.93] p = 0.760	OR = 1.22 [0.45-3.29] p = 0.700	OR = 1.07 [0.62-1.83]	OR = 0.94 [0.55-1.60]
				p = 0.808	
LC vs GK OR, 95% CI P	OR = 0.84 [0.35-2.02] p = 0.688	OR = 0.67 [0.30-1.48] p = 0.317	OR = 0.88 [0.32-2.38] p = 0.797	OR = 0.89 [0.52-1.53]	OR = 1.12 [0.66-1.93]
				p = 0.672	
LC vs WZJG OR, 95% CI P	OR = 0.84 [0.40-1.76] p = 0.650	OR = 1.33 [0.70-2.52] p = 0.384	OR = 1.39 [0.60-3.21] p = 0.446	OR = 1.20 [0.78-1.84]	OR = 0.83 [0.54-1.28]
				p = 0.399	

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna
OR: iloraz szans (odds ratio), CI: przedział ufności (confidence interval)

Analizując częstości alleli i genotypów w polimorficznym miejscu ApaI w genie VDR nie zaobserwowano istotnych różnic w badanych grupach.

4.9 Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

Tabela 17 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej.

	Genotypy (%)			Allele (%)	
	TT	Tt	tt	T	t
NChZJ n=172	59 (34.3%)	79 (45.9%)	34 (19.8%)	197 (57.3%)	147 (42.7%)
WZJG (n=87)	31 (35.6%)	36 (41.4%)	20 (23%)	98 (56.3%)	76 (43.7%)
LC (n=85)	28 (32.9%)	43 (50.6%)	14 (16.5%)	99 (58.2%)	71 (41.8%)
GK (n=39)	13 (33.3%)	23 (59.0%)	3 (7.7%)	49 (62.8%)	29 (37.2%)

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

Tabela 17 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) między badanymi grupami.

	[tt] vs [TT+Tt]	[TT] vs [Tt+tt]	[tt] vs [TT]	[T] vs [t]	[t] vs [T]
NChZJ vs GK OR, 95% CI P-value	OR = 2.96 [0.86-10.18] p = 0.073	OR = 1.04 [0.50-2.18] p = 0.908	OR = 2.45 [0.66-9.39] p = 0.165	OR = 0.79 [0.48-1.32] p = 0.370	OR = 1.26 [0.76-2.09] p = 0.370
WZJG vs GK OR, 95% CI P-value	OR = 3.58 [1.00-12.87] p = 0.040	OR = 1.11 [0.50-2.46] p = 0.802	OR = 2.80 [0.71-11.06] p = 0.133	OR = 0.76 [0.44-1.32] p = 0.333	OR = 1.31 [0.76-2.27] p = 0.333
LC vs GK OR, 95% CI P-value	OR = 2.37 [0.64-8.77] p = 0.187	OR = 0.98 [0.44-2.20] p = 0.965	OR = 2.17 [0.53-8.87] p = 0.275	OR = 0.83 [0.48-1.43] p = 0.494	OR = 1.21 [0.70-2.10] p = 0.494
LC vs WZJG OR, 95% CI P-value	OR = 0.66 [0.31-1.41] p = 0.283	OR = 0.89 [0.47-1.67] p = 0.710	OR = 0.78 [0.33-1.82] p = 0.558	OR = 1.08 [0.71-1.66] p = 0.720	OR = 0.93 [0.60-1.42] p = 0.720

NChZJ: nieswoiste choroby zapalne jelit (LC+WZJG), LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna

OR: iloraz szans (odds ratio), CI: przedział ufności (confidence interval)

Zaobserwowano, że genotyp tt był częstszy u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż u osób z grupy kontrolnej i chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna

(odpowiednio 23% w porównaniu z 7,7% i 16,5%). Porównując całą grupę pacjentów z NChZJ z grupą kontrolną wykazano, że genotyp tt był prawie 3-krotnie częstszy niż genotypy TT + Tt (OR = 2,96), ale obserwacja ta była jedynie zbliżona do granicy zakładanej istotności statystycznej ($p = 0,073$). Ta sama analiza przeprowadzona w grupie WZJG wykazała, że u tych pacjentów homozygoty tt występowały jeszcze częściej (OR = 3,58, CI = [1,00-12.87], $p = 0,040$).

4.10 Porównanie genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych

W tabeli 18 przedstawiono porównanie genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych.

Tabela 18. Porównanie genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych.

Parametr	FokI			
	LC			
	FF (n=32)	Ff (n=44)	ff (n=9)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,13 ± 0,18 ¹	1,12 + 0,19	1,08 + 0,16	p=0,7809 (ns)
L2-L4 T score	-0,68 + 1,41	-0,85 + 1,52	-1,15 + 1,35	p=0,7700 (ns)
L2-L4 Z score	-0,32 + 1,25	-0,43 + 1,42	-0,62 + 1,15	p=0,8943 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,16	0,95 + 0,20	0,89 + 0,11	p=0,8596 (ns)
SKU T score	-0,59 + 1,14	-0,60 + 1,44	-1,08 + 0,83	p=0,7334 (ns)
SKU Z score	-0,19 + 1,01	-0,25 + 1,19	-0,61 + 0,85	p=0,7110 (ns)
25 OHD (ng/ml)	24,22 + 12,79	20,31 + 12,26	16,98 + 9,54	p=0,2350 (ns)
Parametr	WZJG			
	FF (n=31)	Ff (n=38)	ff (n=18)	
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,19 + 0,14	1,14 + 0,15	1,17 + 0,12	p=0,5236 (ns)
L2-L4 T score	-0,33 + 1,02	-0,59 + 1,30	-0,41 + 1,02	p=0,6681 (ns)
L2-L4 Z score	-0,10 + 1,03	-0,25 + 1,32	-0,18 + 1,18	p=0,9176 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,99 + 0,13	0,98 + 0,17	0,97 + 0,13	p=0,7607 (ns)
SKU T score	-0,23 + 1,04	-0,29 + 1,31	-0,46 + 0,95	p=0,7592 (ns)
SKU Z score	0,13 + 0,98	0,04 + 1,17	0,00 + 0,85	p=0,9538 (ns)
25 OHD (ng/ml)	21,94 + 8,24	20,06 + 8,11	26,47 + 11,93	p=0,0915 (ns)
Parametr	GK			
	FF (n=11)	Ff (n=22)	ff (n=6)	
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,20 + 0,07	1,22 + 0,08	1,26 + 0,08	p=0,2905 (ns)
L2-L4 T score	-0,14 + 0,65	0,12 + 0,72	0,40 + 0,69	p=0,2570 (ns)
L2-L4 Z score	-0,16 + 0,72	0,14 + 0,60	0,35 + 0,75	p=0,1696 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	1,07 + 0,11	1,08 + 0,18	1,07 + 0,14	p=0,9360 (ns)

SKU T score	0,33 + 0,68	0,45 + 1,23	0,43 + 0,83	p=0,9746 (ns)
SKU Z score	0,32 + 0,65	0,41 + 1,21	0,40 + 0,67	p=0,9026 (ns)
25 OHD (ng/ml)	20,08 + 7,79	22,04 + 10,53	22,48 + 6,09	p=0,7736 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

W grupie LC pacjenci z różnymi wariantami polimorfizmu FokI genu *VDR* nie różnili się istotnie statystycznie pod względem badanych zmiennych. Podobnie istotnych różnic statystycznych nie odnotowano między pacjentami z WZJG i w grupie kontrolnej.

4.11 Porównanie genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych

W tabeli 19 przedstawiono porównanie genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych.

Tabela 19. Porównanie genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach .

Parametr	BsmI			
	LC			
	BB (n=14)	Bb (n=45)	bb (n=26)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,15+ 0,19 ¹	1,11 + 0,19	1,13 + 0,16	p=0,9005 (ns)
L2-L4 T score	-0,61 + 1,61	-0,94 + 1,57	-0,73 + 1,16	p=0,8656 (ns)
L2-L4 Z score	-0,23 + 1,40	-0,49 + 1,40	-0,35 + 1,16	p=0,8810 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,96 + 0,19	0,95 + 0,18	0,94 + 0,16	p=0,9988 (ns)
SKU T score	-0,52 + 1,58	-0,65 + 1,33	-0,73 + 1,04	p=0,9907 (ns)
SKU Z score	-0,17 + 1,41	-0,26 + 1,11	-0,32 + 0,86	p=0,9568 (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,62 + 15,07	22,09 + 11,03	19,64 + 13,14	p=0,4828 (ns)
Parametr	WZJG			
	BB (n=22)	Bb (n=34)	bb (n=31)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,20 + 0,13	1,16 + 0,16	1,15 + 0,12	p=0,3197 (ns)

L2-L4 T score	-0,33 + 0,85	-0,48 + 1,37	-0,55 + 1,09	p=0,6556 (ns)
L2-L4 Z score	-0,09 + 0,80	-0,21 + 1,34	-0,21 + 1,26	p=0,8610 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	1,04 + 0,14	0,96 + 0,16	0,97 + 0,14	p=0,0714 [BB]vs [Bb] p=0,0835
SKU T score	-0,00 + 0,97	-0,45 + 1,32	-0,36 + 1,02	p=0,2165 (ns)
SKU Z score	0,30 + 0,87	-0,04 + 1,18	0,01 + 0,99	p=0,3144 (ns)
25 OHD (ng/ml)	21,31 + 8,77	21,14 + 8,47	23,60 + 10,48	p=0,8869 (ns)
Parametr	GK			
	BB (n=3)	Bb (n=23)	bb (n=13)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,31 + 0,04	1,20 + 0,07	1,25 + 0,09	p=0,0321 [bb] vs [Bb] p=0,2105 [bb] vs [BB] p=0,7463 [BB] vs [Bb] p=0,0778
L2-L4 T score	0,80 + 0,30	-0,13 + 0,68	0,32 + 0,66	p=0,0248 [bb] vs [Bb] p=0,1544 [bb] vs [BB] p=0,8062 [BB] vs [Bb] p=0,0724
L2-L4 Z score	0,54 + 0,52	-0,11 + 0,69	0,34 + 0,51	p=0,0255 [bb] vs [Bb] p=0,0635 [bb] vs [BB] p=1,0000 [BB] vs [Bb] p=0,1871
SKU BMD (g/cm ²)	1,03 + 0,14	1,10 + 0,18	1,04 + 0,12	p=0,5807 (ns)
SKU T score	0,12 + 0,81	0,53 + 1,19	0,28 + 0,76	p=0,7637 (ns)
SKU Z score	0,10 + 0,62	0,46 + 1,18	0,31 + 0,66	p=0,9315 (ns)
25 OHD (ng/ml)	18,34 + 2,86	22,04 + 10,65	21,44 + 7,11	p=0,7687 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

W grupie LC, osoby z różnymi wariantami polimorfizmu BsmI genu *VDR* nie różniły się istotnie statystycznie pod względem badanych zmiennych. Podobnie istotnych różnic statystycznych na poziomie 0,05 nie odnotowano między osobami z WZJG. Jedynie w przypadku SKU BMD różnica między wariantami polimorfizmu uzyskała wartość p=0,0714, która była bliska zakładanej istotności statystycznej (0,05). W porównaniach szczegółowych wykazano, że wartość p dla różnicy między homozygotami BB a heterozygotami Bb również była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła p=0,0835. W grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu BsmI genu *VDR* różniły się istotnie statystycznie pod

względem BMD L2-L4. W porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic natomiast (BB vs Bb) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0778$. W grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu BsmI genu VDR różniły się istotnie statystycznie pod względem L2-L4 T score ($p<0,05$). Jednak w porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic natomiast (BB vs Bb) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0724$. Ponadto w grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu BsmI genu VDR różniły się istotnie statystycznie pod względem L2-L4 Z score ($p<0,05$), natomiast w porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic (bb vs Bb) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0635$.

4.12 Porównanie genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych

W tabeli 20 przedstawiono porównanie genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych.

Tabela 20. Porównanie genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach.

Parametr	ApaI			
	LC			
	AA (n=25)	Aa (n=41)	aa (n=19)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,12 + 0,20 ¹	1,11 + 0,18	1,14 + 0,17	$p=0,7705$ (ns)
L2-L4 T score	-0,87 + 1,64	-0,89 + 1,46	-0,60 + 1,22	$p=0,6908$ (ns)
L2-L4 Z score	-0,46 + 1,49	-0,49 + 1,26	-0,14 + 1,24	$p=0,5130$ (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,97 + 0,18	0,93 + 0,18	0,95 + 0,17	$p=0,8495$ (ns)
SKU T score	-0,50 + 1,41	-0,73 + 1,29	-0,70 + 1,11	$p=0,9134$ (ns)
SKU Z score	-0,18 + 1,24	-0,33 + 1,10	-0,24 + 0,87	$p=0,8921$ (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,12 + 12,13	22,28 + 12,49	18,69 + 12,46	$p=0,4361$ (ns)
Parametr	WZJG			

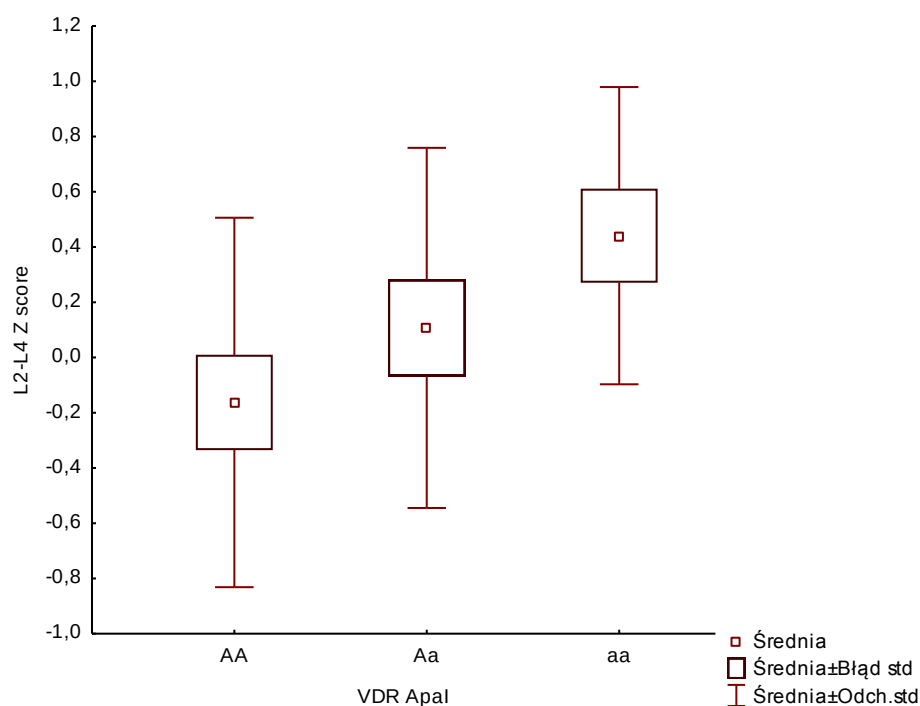
	AA (n=31)	Aa (n=39)	aa (n=17)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,19 + 0,13	1,14 + 0,15	1,17 + 0,13	p=0,1566 (<i>ns</i>)
L2-L4 T score	-0,35 + 0,93	-0,63 + 1,31	-0,28 + 1,11	p= 0,2307 (<i>ns</i>)
L2-L4 Z score	-0,13 + 0,84	-0,37 + 1,36	0,15 + 1,27	p=0,2509 (<i>ns</i>)
SKU BMD (g/cm ²)	1,02 + 0,13	0,96 + 0,17	0,97 + 0,13	p=0,1391 (<i>ns</i>)
SKU T score	-0,15 + 0,97	-0,42 + 1,31	-0,33 + 1,02	p=0,4029 (<i>ns</i>)
SKU Z score	0,19 + 0,82	-0,09 + 1,20	0,18 + 0,10	p=0,2612 (<i>ns</i>)
25 OHD (ng/ml)	20,77 + 8,37	21,64 + 8,67	25,37 + 11,69	p=0,6855 (<i>ns</i>)
Parametr	GK			
	AA (n=15)	Aa (n=14)	aa (n=10)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,20 + 0,08	1,22 + 0,06	1,26 + 0,10	p=0,2189 (<i>ns</i>)
L2-L4 T score	-0,13 + 0,63	0,11 + 0,71	0,41 + 0,72	p=0,1659 (<i>ns</i>)
L2-L4 Z score	-0,16 + 0,67	0,11 + 0,65	0,44 + 0,54	p=0,0468 [aa] vs [Aa] p=0,4596 [aa] vs [AA] p=0,0401 [AA] vs [Aa] p=0,7796
SKU BMD (g/cm ²)	1,05 + 0,12	1,11 + 0,21	1,06 + 0,11	p=0,7971 (<i>ns</i>)
SKU T score	0,22 + 0,76	0,59 + 1,43	0,45 + 0,73	p=0,6309 (<i>ns</i>)
SKU Z score	0,17 + 0,70	0,53 + 1,41	0,48 + 0,61	p=0,5615 (<i>ns</i>)
25 OHD (ng/ml)	21,89 +10,98	23,14 + 9,03	18,84 + 5,75	p=0,4922 (<i>ns</i>)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodzące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant, *vs*: versus

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

W grupie LC, osoby z różnymi wariantami polimorfizmu ApaI genu *VDR* nie różniły się istotnie statystycznie pod względem badanych zmiennych. Podobnie istotnych różnic statystycznych nie odnotowano między osobami z WZJG. Osoby z grupy kontrolnej z poszczególnymi wariantami polimorfizmu ApaI różniły istotnie statystycznie pod względem Z score dla L2-L4 kręgosłupa ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z grupy kontrolnej będące homozygotami AA miały istotnie statystycznie niższy Z score L2-L4 od homozygot aa ($p < 0,05$). Z score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 Z score) dla grupy kontrolnej (GK) w podgrupach o różnym wariacie polimorfizmu ApaI genu *VDR* przedstawiono graficznie na rycinie nr 8.



Rycina 8. Z score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 Z score) dla grupy kontrolnej (GK) w podgrupach o różnym wariancie polimorfizmu Apol genu VDR.

4.13 Porównanie genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych

W tabeli 21 przedstawiono porównanie genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych.

Tabela 21. Porównanie genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach.

Parametr	TaqI			
	LC			
	TT (n=28)	Tt (n=43)	tt (n=14)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,11 + 0,19 ¹	1,12 + 0,18	1,15 + 0,19	p=0,978 (ns)
L2-L4 T score	-0,87 + 1,45	-0,85 + 1,44	-0,61 + 1,61	p=0,972 (ns)
L2-L4 Z score	-0,44 + 1,41	-0,44 + 1,26	-0,23 + 1,40	p=0,900 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,94 + 0,15	0,95 + 0,19	0,96 + 0,19	p=0,999 (ns)

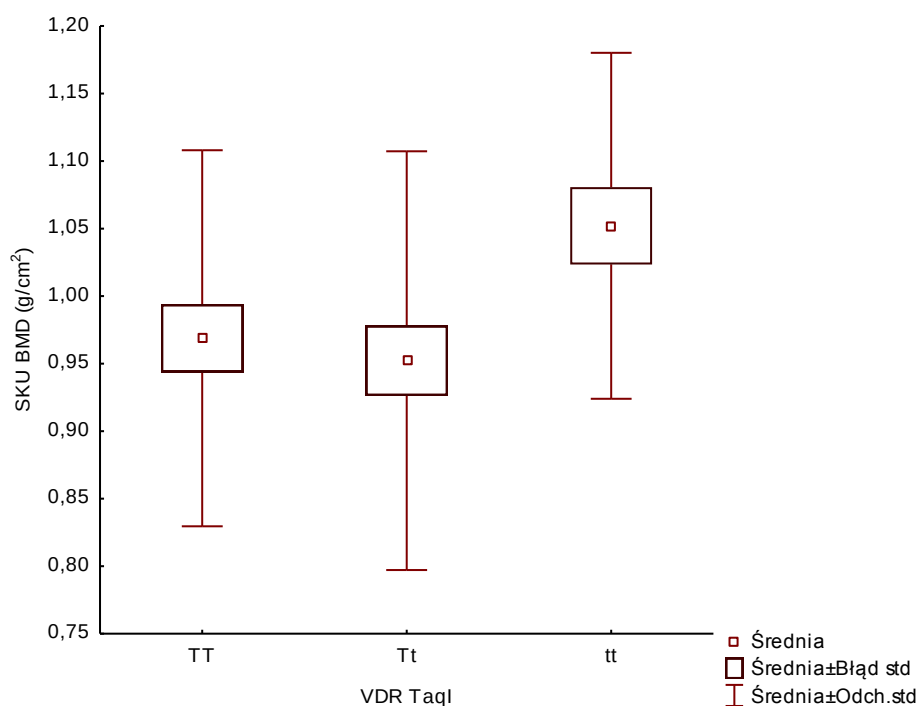
SKU T score	-0,71 + 1,00	-0,66 + 1,36	-0,52 + 1,58	p=0,975 (ns)
SKU Z score	-0,30 + 0,82	-0,28 + 1,14	-0,17 + 1,41	p=0,924 (ns)
25 OHD (ng/ml)	20,04 + 12,44	21,95 + 11,47	22,62 + 15,07	p=0,615 (ns)
Parametr	WZJG			
	TT (n=31)	Tt (n=36)	tt (n=20)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,15 + 0,12	1,15 + 0,16	1,21 + 0,13	p=0,144 (ns)
L2-L4 T score	-0,55 + 1,09	-0,52 + 1,36	-0,23 + 0,78	p=0,405 (ns)
L2-L4 Z score	-0,21 + 1,26	-0,24 + 1,32	-0,03 + 0,78	p=0,711 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,97 + 0,14	0,95 + 0,16	1,05 + 0,12	p=0,020 [tt] vs [Tt] p=0,020 [tt] vs [TT] p=0,080 [TT] vs [Tt] p=1,000
SKU T score	-0,36 + 1,02	-0,49 + 1,30	0,10 + 0,94	p=0,091 (ns)
SKU Z score	0,01 + 0,99	-0,06 + 1,15	0,37 + 0,86	p=0,175 (ns)
25 OHD (ng/ml)	23,60 + 10,48	20,97 + 8,77	21,63 + 8,22	p=0,841 (ns)
Parametr	GK			
	TT (n=13)	Tt (n=23)	tt (n=3)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,25 + 0,09	1,20 + 0,07	1,31 + 0,04	p=0,032 [tt] vs [Tt] p=0,078 [tt] vs [TT] p=0,746 [TT] vs [Tt] p=0,211
L2-L4 T score	0,32 + 0,66	-0,13 + 0,68	0,80 + 0,30	p=0,025 [tt] vs [Tt] p=0,072 [tt] vs [TT] p=0,806 [TT] vs [Tt] p=0,154
L2-L4 Z score	0,34 + 0,51	-0,11 + 0,70	0,54 + 0,52	p=0,026 [tt] vs [Tt] p=0,187 [tt] vs [TT] p=1,000 [TT] vs [Tt] p=0,063
SKU BMD (g/cm ²)	1,04 + 0,12	1,10 + 0,18	1,03 + 0,14	p=0,581 (ns)
SKU T score	0,28 + 0,76	0,53 + 1,19	0,12 + 0,81	p=0,767 (ns)
SKU Z score	0,31 + 0,66	0,46 + 1,18	0,10 + 0,62	p=0,932 (ns)
25 OHD (ng/ml)	21,44 + 7,11	22,04 + 10,65	18,34 + 2,86	p=0,769 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant, vs: versus

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

W grupie LC, osoby z różnymi wariantami polimorfizmu TaqI genu VDR nie różniły się istotnie statystycznie pod względem badanych zmiennych. Osoby z WZJG z poszczególnymi wariantami polimorfizmu TaqI różniły istotnie statystycznie gęstością mineralną kości szyjki kości udowej (SKU) ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że osoby z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego będące heterozygotami Tt miały niższą gęstość mineralną kości niż homozygoty tt ($p < 0,05$). Natomiast różnica pomiędzy osobami z wariantami tt oraz TT nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, natomiast wartość p była bliska zakładanej istotności i wynosiła $p = 0,080$. W grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu TaqI genu VDR różniły się istotnie statystycznie pod względem BMD L2-L4 ($p < 0,05$). W porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic natomiast (tt vs Tt) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej, która wynosiła $p = 0,078$. W grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu TaqI genu VDR różniły się istotnie statystycznie pod względem L2-L4 T score ($p < 0,05$). Jednak w porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic natomiast (tt vs Tt) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p = 0,072$. Ponadto w grupie kontrolnej osoby z różnymi wariantami polimorfizmu TaqI genu VDR różniły się istotnie statystycznie pod względem L2-L4 Z score ($p < 0,05$), natomiast w porównaniach wielokrotnych żadna z różnic nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05. Jedna z różnic (TT vs Tt) uzyskała wartość p bliską zakładanej istotności statystycznej, która wynosiła $p = 0,063$. Gęstości mineralne szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm^2)) dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) w podgrupach o różnym wariantie polimorfizmu TaqI genu VDR zilustrowano na rycinie 9.



Rycina 9. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm²)) dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) w podgrupach o różnym wariacie polimorfizmu TaqI genu VDR.

4.14 Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C)

W tabeli 22 przedstawiono porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C).

Tabela 22. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C).

Parametr	FokI			
	FF			
	LC (n=32)	WZJG (n=31)	GK (n=11)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,13 + 0,18 ¹	1,19 + 0,14	1,20 + 0,07	p=0,2273 (<i>ns</i>)
L2-L4 T score	-0,68 + 1,41	-0,33 + 1,02	-0,14 + 0,65	p=0,2272 (<i>ns</i>)
L2-L4 Z score	-0,32 + 1,25	-0,10 + 1,03	-0,16 + 0,72	p=0,5810 (<i>ns</i>)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,16	0,99 + 0,13	1,07 + 0,11	p=0,0371

				*p=0,7125 **p=0,0323 ***p=0,2723
SKU T score	-0,59 + 1,14	-0,23 + 1,04	0,33 + 0,68	p=0,0234 *p=0,4027 **p=0,0223 ***p=0,3354
SKU Z score	-0,19 + 1,01	0,13 + 0,98	0,32 + 0,65	p=0,0967 (ns)
25 OHD (ng/ml)	24,22 + 12,79	21,94 + 8,24	20,08 + 7,79	p=0,6288 (ns)
Parametr	Ff			
	LC (n=44)	WZJG (n=38)	GK (n=22)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,12 + 0,19	1,14 + 0,15	1,22 + 0,08	p=0,0579 *p=1,0000 **p=0,0687 ***p=0,1279
L2-L4 T score	-0,85 + 1,52	-0,59 + 1,30	0,12 + 0,72	p=0,0171 *p=1,0000 **p=0,0150 ***p=0,0826
L2-L4 Z score	-0,43 + 1,42	-0,25 + 1,32	0,14 + 0,60	p=0,2333 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,20	0,98 + 0,17	1,08 + 0,18	p=0,0771 *p=1,0000 **p=0,0795 ***p=0,2238
SKU T score	-0,60 + 1,44	-0,29 + 1,31	0,45 + 1,23	p=0,0290 *p=1,0000 **p=0,0248 ***p=0,1499
SKU Z score	-0,25 + 1,19	0,04 + 1,17	0,41 + 1,21	p=0,1689 (ns)
25 OHD (ng/ml)	20,31 + 12,26	20,06 + 8,11	22,04 + 10,53	p=0,7202 (ns)
Parametr	ff			

	LC (n=9)	WZJG (n=18)	GK (n=6)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,08 + 0,16	1,17 + 0,12	1,26 + 0,08	p=0,0578 *p=0,6704 **p=0,0509 ***p=0,3190
L2-L4 T score	-1,15 + 1,35	-0,41 + 1,02	0,40 + 0,69	p=0,0360 *p=0,7031 **p=0,0303 ***p=0,1945
L2-L4 Z score	-0,62 + 1,15	-0,18 + 1,18	0,35 + 0,75	p=0,2429 (<i>ns</i>)
SKU BMD (g/cm ²)	0,89 + 0,11	0,97 + 0,13	1,07 + 0,14	p=0,0656 *p=0,6159 **p=0,0589 ***p=0,3921
SKU T score	-1,08 + 0,83	-0,46 + 0,95	0,43 + 0,83	p=0,0218 *p=0,7629 **p=0,0180 ***p=0,1114
SKU Z score	-0,61 + 0,85	0,00 + 0,85	0,40 + 0,67	p=0,1218 (<i>ns</i>)
25 OHD (ng/ml)	16,98 + 9,54	26,47 + 11,93	22,48 + 6,09	p=0,1552 (<i>ns</i>)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

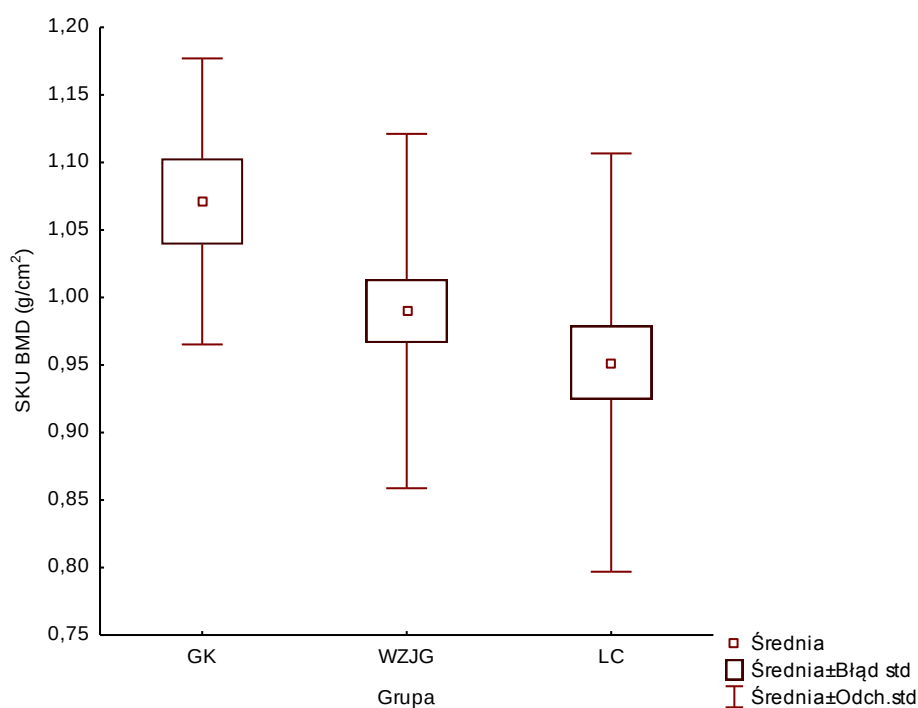
ns: non-significant, vs: versus

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Liczba gwiazdek oznacza grupy zawarte w porównaniu, następująco:

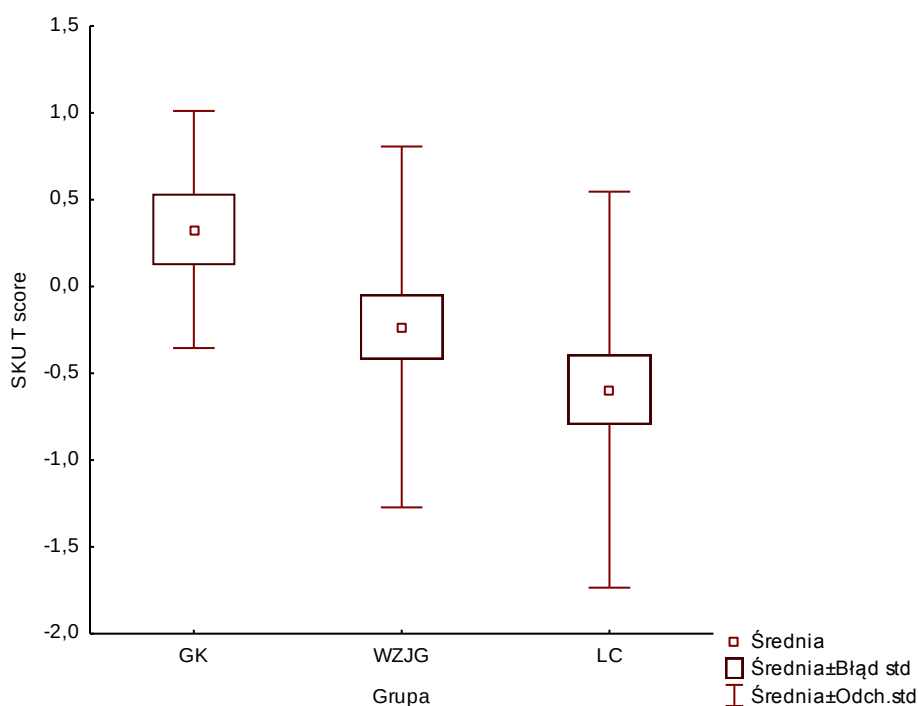
* LC vs WZJG, ** LC vs grupa kontrolna, *** WZJG vs grupa kontrolna

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami FF z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej bliższego końca szyjki udowej ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotą FF mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną SKU od pacjentów homozygot FF z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą FF przedstawiono graficznie na rycinie 10.



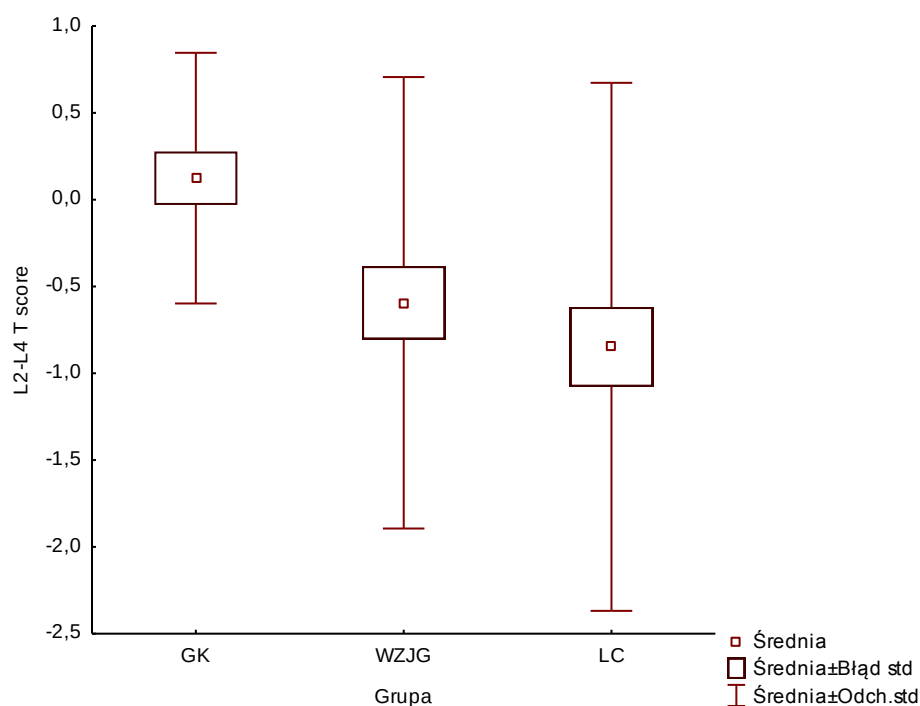
Rycina 10. Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm^2)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crochna (LC) będących homozygotą FF.

Pacjenci z badanych grup będący homozygotami FF istotnie statystycznie różnili się T score SKU ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że pacjenci z LC mieli istotnie niższy T score SKU niż osoby z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crochna (LC) będących homozygotą FF zilustrowano na rycinie 11.



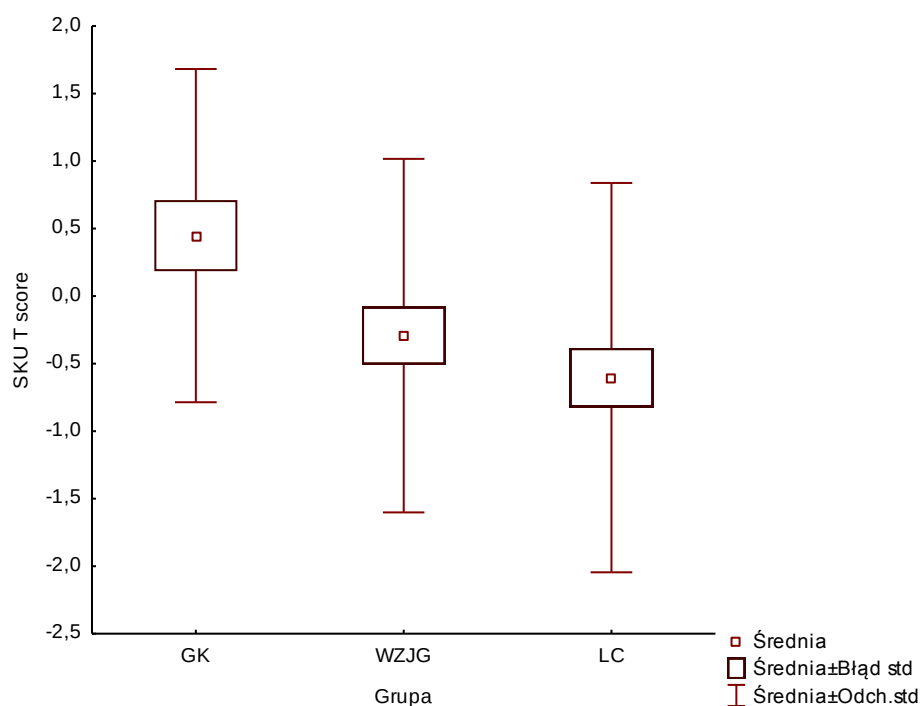
Rycina 11. T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crochna (LC) będących homozygotą FF.

W przypadku BMD L2-L4 różnica pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0579$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0687$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score L2-L4 ($p<0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący heterozygotami Ff mieli istotnie statystycznie niższy T score L2-L4 niż heterozygoty Ff z grupy kontrolnej ($p<0,05$). T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crochna (LC) będących heterozygotą Ff przedstawiono graficznie na rycinie 12.



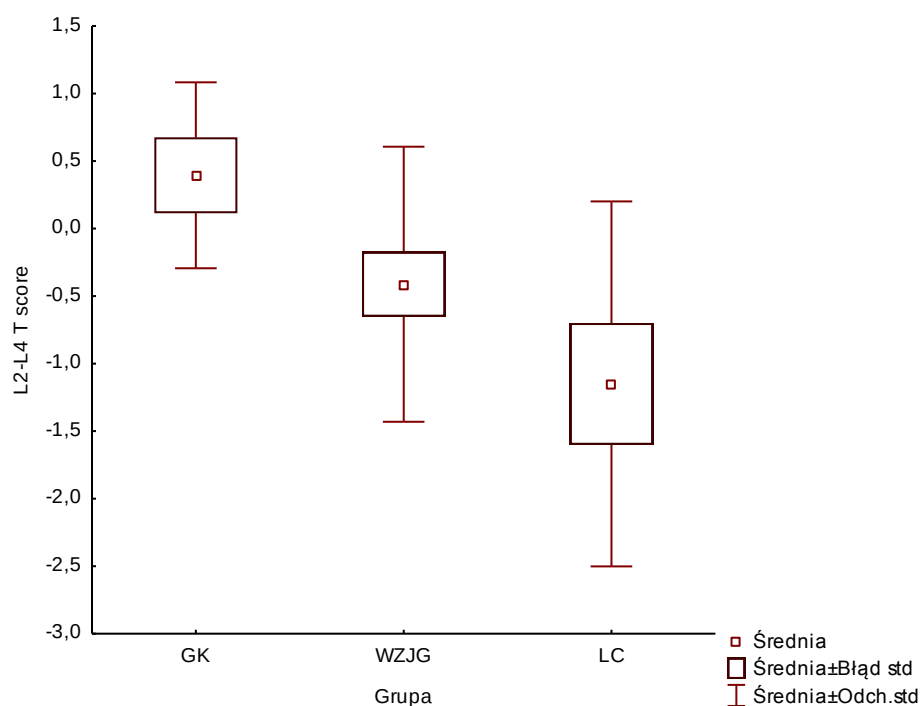
Rycina 12. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Ff.

W przypadku BMD SKU różnica pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0771$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0795$). Pacjenci z badanych grup będący heterozygotami Ff istotnie statystycznie różnili się T score SKU ($p<0,05$). Porównania szczegółowe wykazały, że heterozygoty Ff z grupy LC miały istotnie statystycznie niższy T score SKU niż heterozygoty Ff z grupy kontrolnej ($p<0,05$). T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Ff zilustrowano na rycinie 13.



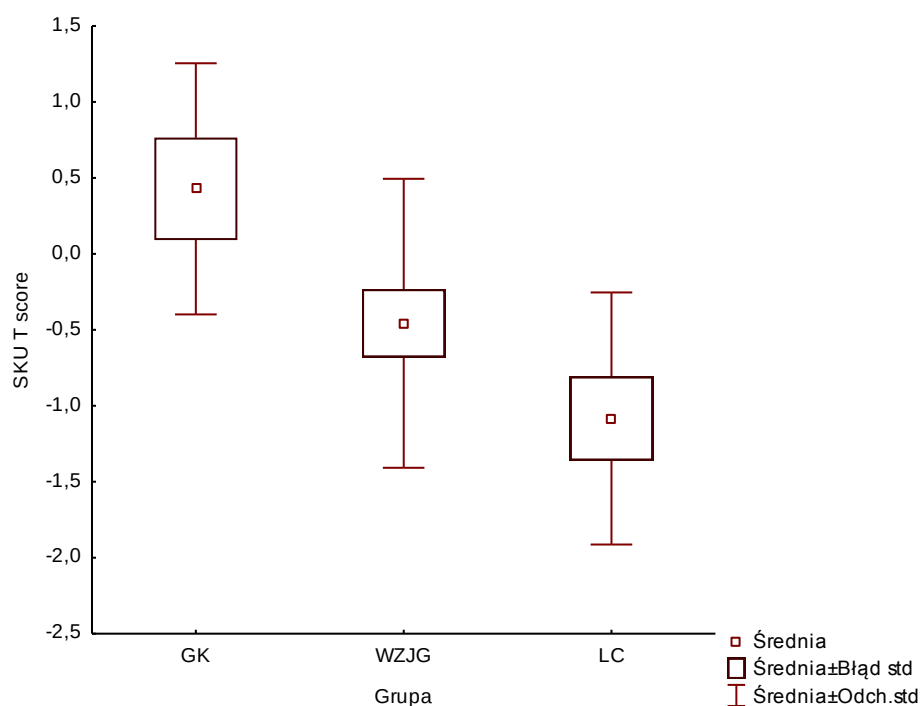
Rycina 13. T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Ff.

W przypadku BMD L2-L4 różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0578$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0509$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score L2-L4 ($p<0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotami ff mieli istotnie statystycznie niższy T score L2-L4 niż homozygoty ff z grupy kontrolnej ($p<0,05$). T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff przedstawiono graficznie na rycinie 14.



Rycina 14. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff.

W przypadku BMD SKU różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami ff z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0656$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0589$). Pacjenci z badanych grup będący homozygotami ff istotnie statystycznie różnili się T score SKU ($p<0,05$). Porównania szczegółowe wykazały, że homozygoty ff z grupy LC miały istotnie statystycznie niższy T score SKU niż homozygoty ff z grupy kontrolnej ($p<0,05$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff zilustrowano na rycinie 15.



Rycina 15. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff.

W badanych grupach wśród osób z różnymi wariantami polimorfizmu FokI genu *VDR* nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia witaminy D.

4.15 Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A)

W tabeli 23 przedstawiono porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A).

Tabela 23. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A).

Parametr	BsmI			
	BB			
	LC (n=14)	WZJG (n=22)	GK (n=3)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,15+ 0,19 ¹	1,20 + 0,13	1,31 + 0,04	p=0,0832 (<i>ns</i>)

L2-L4 T score	-0,61 + 1,61	-0,33 + 0,85	0,80 + 0,30	p=0,0670 *p=1,0000 **p=0,0604 ***p=0,1339
L2-L4 Z score	-0,23 + 1,40	-0,09 + 0,80	0,54 + 0,52	p=0,2532 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,96 + 0,19	1,04 + 0,14	1,03 + 0,14	p=0,3555 (ns)
SKU T score	-0,52 + 1,58	-0,00 + 0,97	0,12 + 0,81	p=0,3434 (ns)
SKU Z score	-0,17 + 1,41	0,30 + 0,87	0,10 + 0,62	p=0,2297 (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,62 + 15,07	21,31 + 8,77	18,34 + 2,86	p=0,8138 (ns)
Parametr	Bb			
	LC (n=45)	WZJG (n=34)	GK (n=23)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,11 + 0,19	1,16 + 0,16	1,20 + 0,07	p=0,1297 (ns)
L2-L4 T score	-0,94 + 1,57	-0,48 + 1,37	-0,13 + 0,68	p=0,0620 *p=0,8443 **p=0,0563 ***p=0,5558
L2-L4 Z score	-0,49 + 1,40	-0,21 + 1,34	-0,11 + 0,69	p=0,5217 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,18	0,96 + 0,16	1,10 + 0,18	p=0,0026 *p=1,0000 **p=0,0036 ***p=0,0094
SKU T score	-0,65 + 1,33	-0,45 + 1,32	0,53 + 1,19	p=0,0022 *p=1,0000 **p=0,0024 ***p=0,0116
SKU Z score	-0,26 + 1,11	-0,04 + 1,18	0,46 + 1,18	p=0,0759 *p=1,000 **p=0,0707 ***p=0,3597
25 OHD (ng/ml)	22,09 + 11,03	21,14 + 8,47	22,04 + 10,65	p=0,9753 (ns)
Parametr	bb			
	LC (n=9)	WZJG (n=18)	GK (n=6)	p

L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,13 + 0,16	1,15 + 0,12	1,25 + 0,09	p=0,0131 *p=1,0000 **p=0,0134 ***p=0,0364
L2-L4 T score	-0,73 + 1,16	-0,55 + 1,09	0,32 + 0,66	p=0,0057 *p=1,000 **p=0,0048 ***p=0,0268
L2-L4 Z score	-0,35 + 1,16	-0,21 + 1,26	0,34 + 0,51	p=0,0747 *p=1,0000 **p=0,0701 ***p=0,2601
SKU BMD (g/cm ²)	0,94 + 0,16	0,97 + 0,14	1,04 + 0,12	p=0,1510 (ns)
SKU T score	-0,73 + 1,04	-0,36 + 1,02	0,28 + 0,76	p=0,0165 *p=0,9991 **p=0,0131 ***p=0,0941
SKU Z score	-0,32 + 0,86	0,01 + 0,99	0,31 + 0,66	p=0,0697 *p=0,6483 **p=0,0661 ***p=0,5233
25 OHD (ng/ml)	19,64 + 13,14	23,60 + 10,48	21,44 + 7,11	p=0,2813 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant, vs: versus

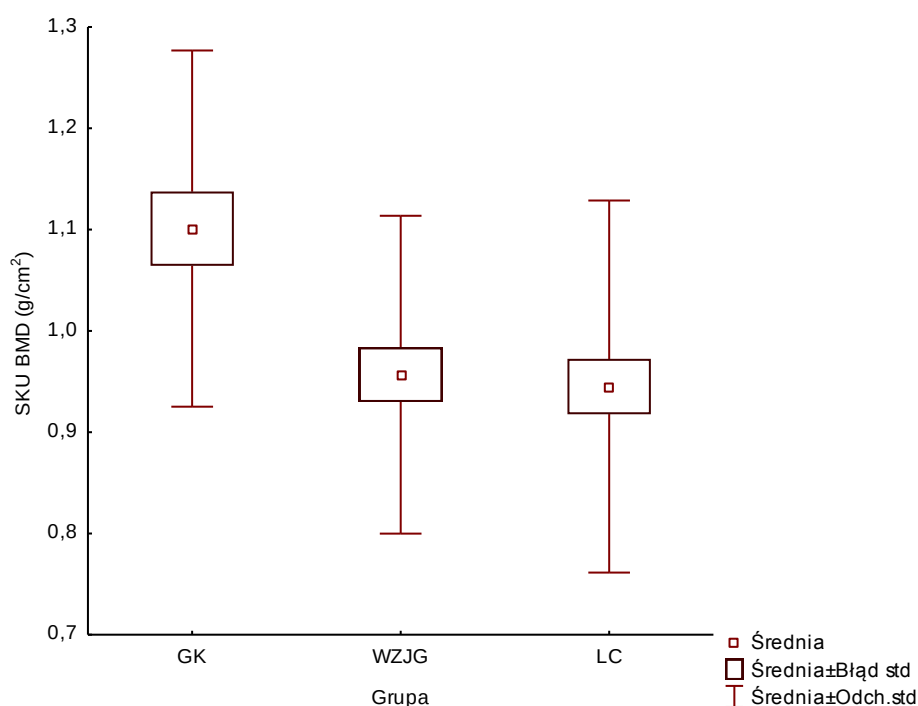
¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Liczba gwiazdek oznacza grupy zawarte w porównaniu, następująco:

* LC vs WZJG, ** LC vs grupa kontrolna, *** WZJG vs grupa kontrolna

W przypadku L2-L4 T score różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami BB z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła p=0,0670. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 (p=0,0604). W przypadku L2-L4 T score różnica pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności

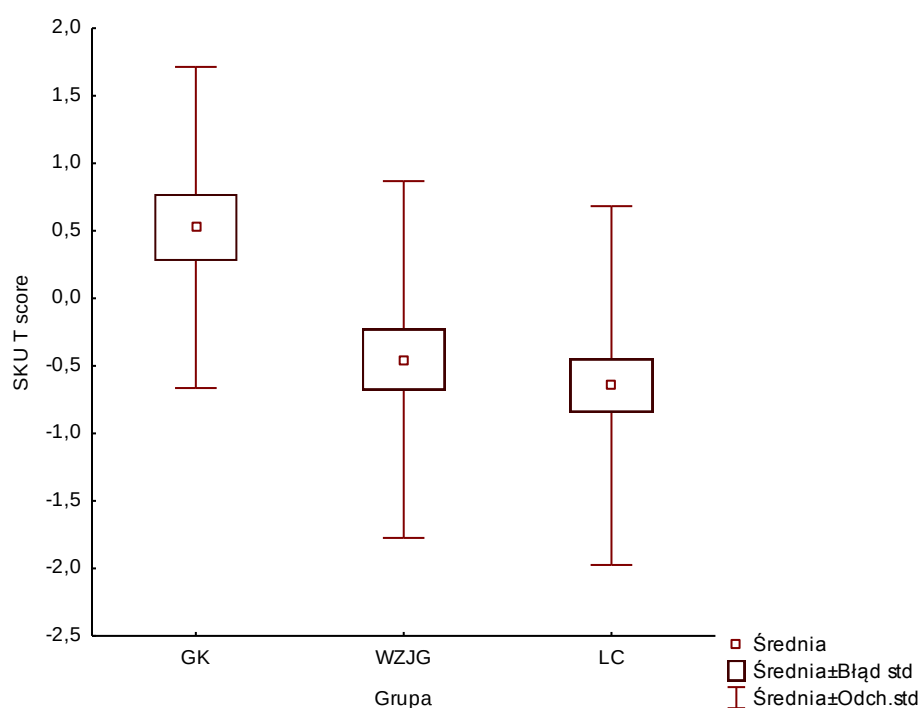
statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0620$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0563$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej bliższego końca kości udowej (SKU) ($p<0,01$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący heterozygotą Bb mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną SKU od pacjentów heterozygot Bb z grupy kontrolnej ($p<0,01$). Ponadto pacjenci z grupy WZJG również charakteryzowali się istotnie statystycznie niższą gęstością mineralną SKU w porównaniu do grupy kontrolnej ($p<0,01$). Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD g/cm^2) grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb przedstawiono graficznie na rycinie 16.



Rycina 16. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD g/cm^2) grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb.

Pacjenci z badanych grup będący heterozygotami Bb istotnie statystycznie różnili się T score SKU ($p<0,01$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że pacjenci z LC mieli istotnie niższy T score SKU niż osoby z grupy kontrolnej ($p<0,01$). Ponadto pacjenci z grupy

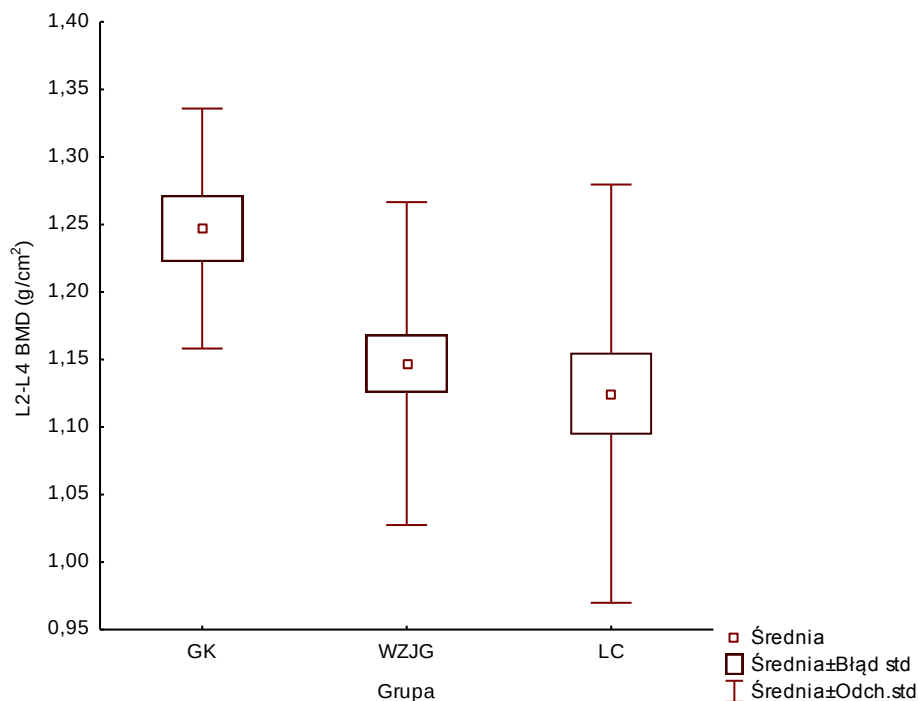
WZJG również charakteryzowali się istotnie statystycznie niższym T score dla SKU w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$). W przypadku SKU Z score różnica pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p = 0,0759$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p = 0,0707$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb zilustrowano na rycinie 17.



Rycina 17. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb.

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej odcinka L2-L4 kręgosłupa ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotą bb mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa niż homozygoty bb z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Ponadto pacjenci z grupy WZJG również charakteryzowali się istotnie statystycznie niższym

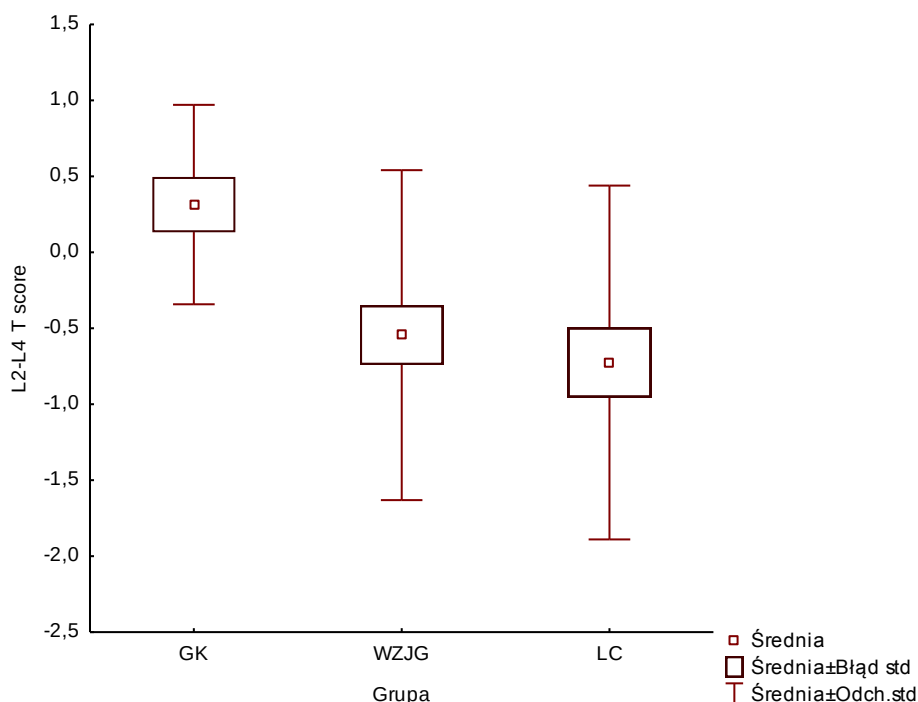
BMD L2-L4 w porównaniu do grupy kontrolnej ($p<0,05$). Gęstość mineralną odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm^2)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących komozygotą bb przedstawiono graficznie na rycinie 18.



Rycina 18. Gęstość mineralna odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm^2)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących komozygotą bb.

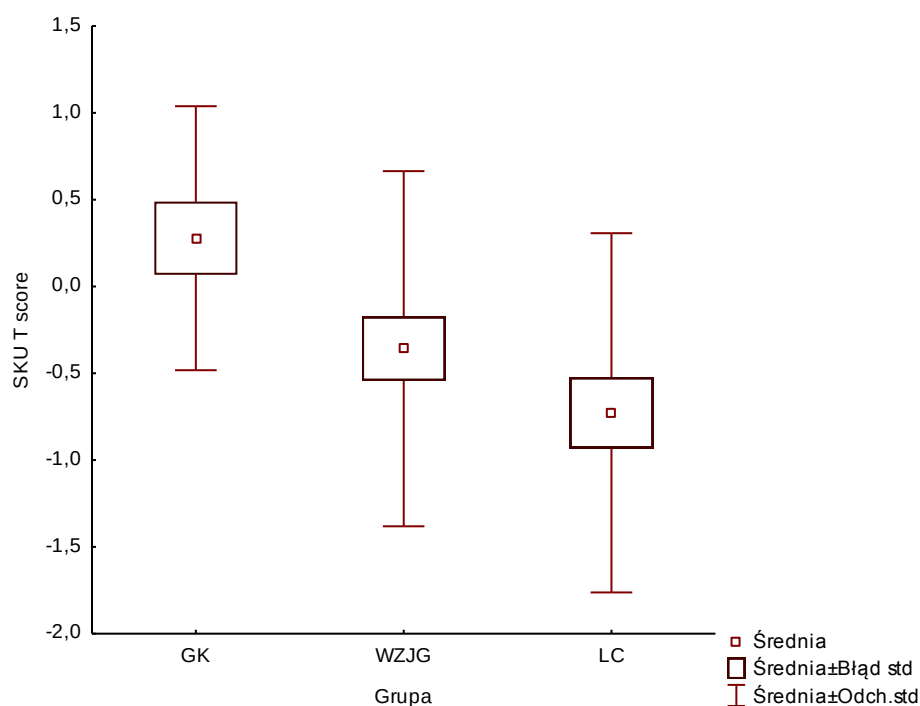
Pacjenci z badanych grup będący homozygotami bb istotnie statystycznie różnili się pod względem T score L2-L4 ($p<0,01$). Porównania szczegółowe wykazały, że homozygoty bb z grupy LC miały istotnie statystycznie niższy T score L2-L4 niż homozygoty bb z grupy kontrolnej ($p<0,01$). Ponadto pacjenci z grupy WZJG również charakteryzowali się istotnie statystycznie niższym T score L2-L4 w porównaniu do grupy kontrolnej ($p<0,05$). W przypadku L2-L4 Z score różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0747$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0701$). T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita

grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb zilustrowano na rycinie 19.



Rycina 19. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb.

Odnótowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score SKU ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotami bb mieli istotnie statystycznie niższy T score SKU niż homozygoty bb z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). W przypadku SKU Z score różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami bb z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p = 0,0697$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p = 0,0661$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb przedstawiono graficznie na rycinie 20.



Rycina 20. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb.

W badanych grupach wśród osób z różnymi wariantami polimorfizmu BsmI genu *VDR* nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia witaminy D.

4.16 Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T)

W tabeli 24 przedstawiono porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T).

Tabela 24. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T).

Parametr	ApaI			
	AA			
	LC (n=25)	WZJG (n=31)	GK (n=15)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,12 + 0,20 ¹	1,19 + 0,13	1,20 + 0,08	p=0,1754 (ns)

L2-L4 T score	-0,87 + 1,64	-0,35 + 0,93	-0,13 + 0,63	p=0,1427 (ns)
L2-L4 Z score	-0,46 + 1,49	-0,13 + 0,84	-0,16 + 0,67	p=0,3719 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,97 + 0,18	1,02 + 0,13	1,05 + 0,12	p=0,1730 (ns)
SKU T score	-0,50 + 1,41	-0,15 + 0,97	0,22 + 0,76	p=0,1595 (ns)
SKU Z score	-0,18 + 1,24	0,19 + 0,82	0,17 + 0,70	p=0,1881 (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,12 + 12,13	20,77 + 8,37	21,89 + 10,98	p=0,9585 (ns)
Parametr	Aa			
	LC (n=41)	WZJG (n=39)	GK (n=14)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,11 + 0,18	1,14 + 0,15	1,22 + 0,06	p=0,0481 *p=1,0000 **p=0,0464 ***p=0,1072
L2-L4 T score	-0,89 + 1,46	-0,63 + 1,31	0,11 + 0,71	p=0,0211 *p=1,0000 **p=0,0176 ***p=0,0682
L2-L4 Z score	-0,49 + 1,26	-0,37 + 1,36	0,11 + 0,65	p=0,1971 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,93 + 0,18	0,96 + 0,17	1,11 + 0,21	p=0,0264 *p=1,0000 **p=0,0232 ***p=0,0731
SKU T score	-0,73 + 1,29	-0,42 + 1,31	0,59 + 1,43	p=0,0129 *p=1,0000 **p=0,0099 ***p=0,0530
SKU Z score	-0,33 + 1,10	-0,09 + 1,20	0,53 + 1,41	p=0,1880 (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,28 + 12,49	21,64 + 8,67	23,14 + 9,03	p=0,8037 (ns)
Parametr	aa			
	LC (n=19)	WZJG (n=17)	GK (n=10)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,14 + 0,17	1,17 + 0,13	1,26 + 0,10	p=0,0731 *p=1,0000

				p=0,0714 *p=0,2555
L2-L4 T score	-0,60 + 1,22	-0,28 + 1,11	0,41 + 0,72	p=0,0436 *p=1,0000 **p=0,0370 ***p=0,2911
L2-L4 Z score	-0,14 + 1,24	0,15 + 1,27	0,44 + 0,54	p=0,2507 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,17	0,97 + 0,13	1,06 + 0,11	p=0,1332 (ns)
SKU T score	-0,70 + 1,11	-0,33 + 1,02	0,45 + 0,73	p=0,0165 *p=1,0000 **p=0,0137 ***p=0,1002
SKU Z score	-0,24 + 0,87	0,18 + 0,10	0,48 + 0,61	p=0,0445 *p=0,5612 **p=0,0406 ***p=0,5648
25 OHD (ng/ml)	18,69 + 12,46	25,37 + 11,69	18,84 + 5,75	p=0,1820 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

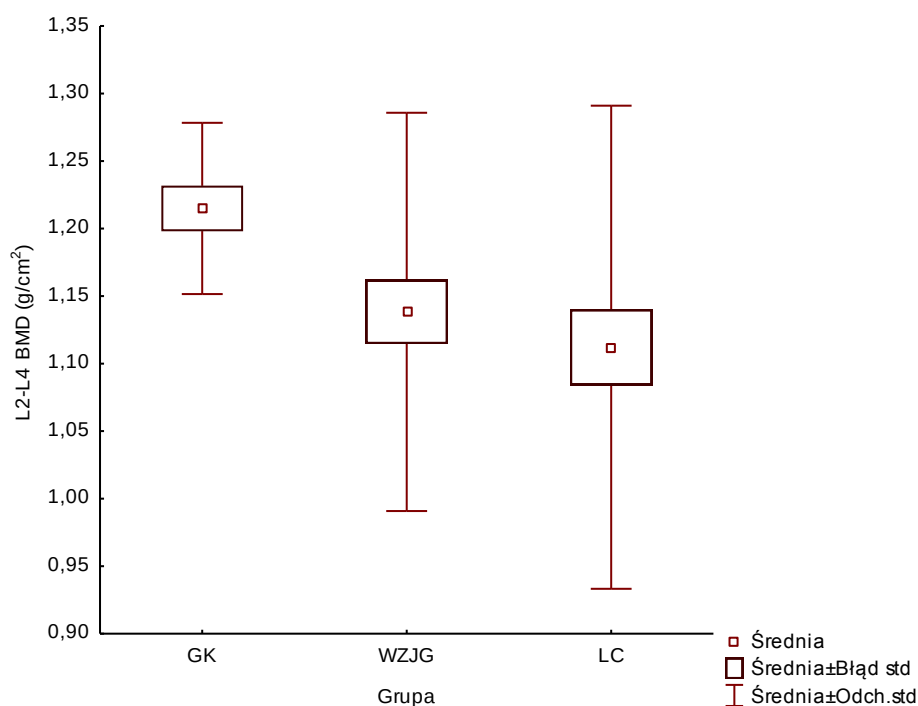
ns: non-significant, vs: versus

¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Liczba gwiazdek oznacza grupy zawarte w porównaniu, następująco:

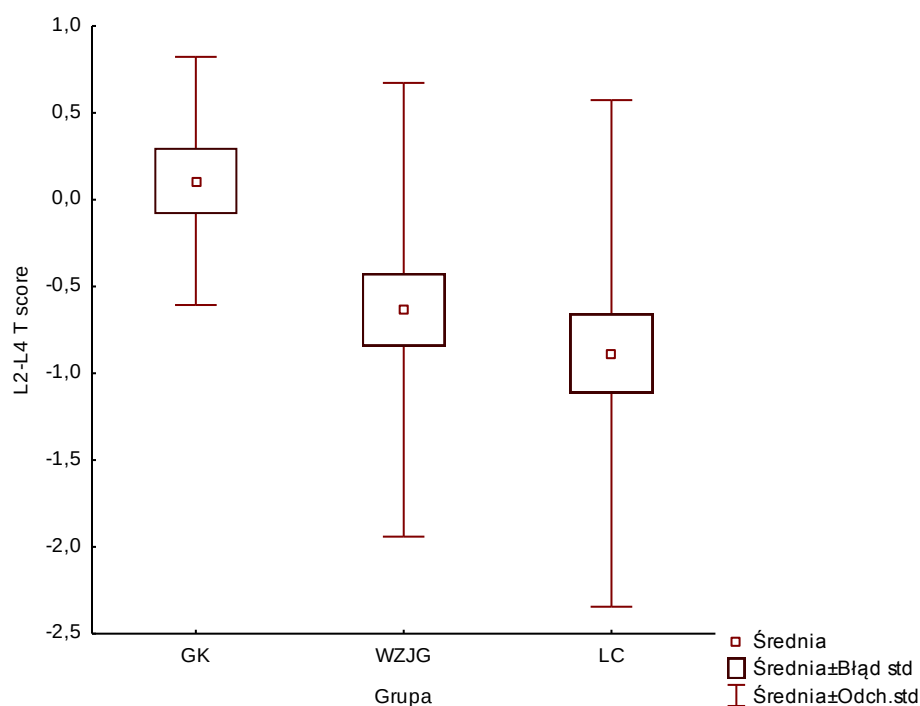
* LC vs WZJG, ** LC vs grupa kontrolna, *** WZJG vs grupa kontrolna

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Aa z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej kości odcinka L2-L4 kręgosłupa ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący heterozygotami Aa mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa od heterozygot Aa z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa zilustrowano na rycinie 21.



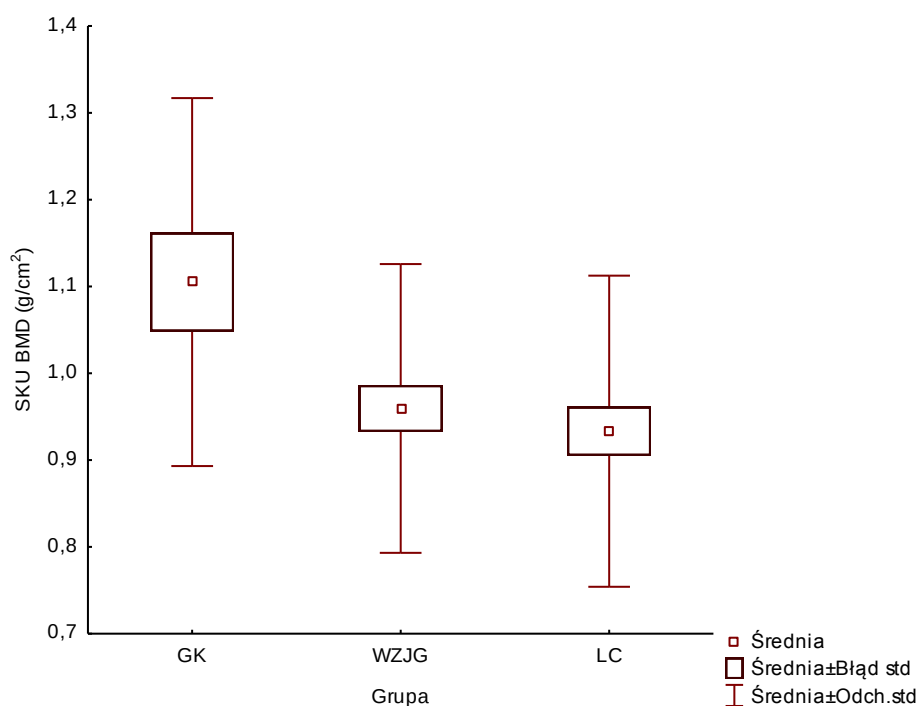
Rycina 21. Gęstość mineralna kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm²) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa.

Pacjenci z badanych grup będący heterozygotami Aa istotnie statystycznie różnili się T score L2-L4 ($p < 0,05$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że pacjenci z LC mieli istotnie niższy T score L2-L4 niż osoby z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Ponadto wartość p dla różnicy między WZJG a grupą kontrolną była bliska wartości 0,05 i wynosiła $p = 0,0682$. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa przedstawiono graficznie na rycinie 22.



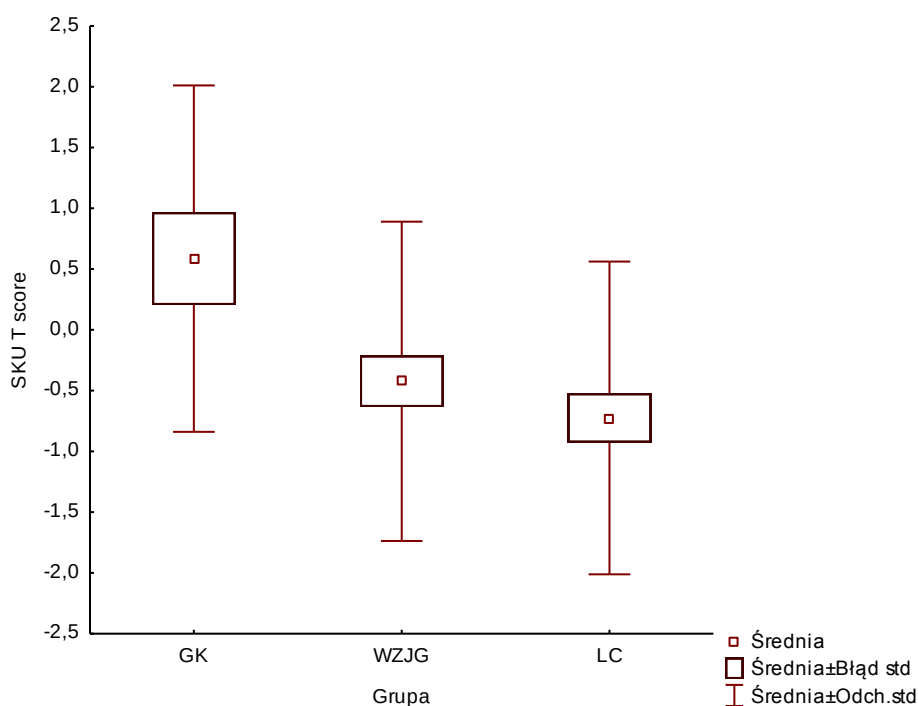
Rycina 22. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa.

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Aa z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej szyjki kości udowej ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący heterozygotą Aa mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną SKU niż heterozygoty Aa z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Ponadto wartość p dla różnicy między WZJG a grupą kontrolną była bliska wartości 0,05 i wynosiła $p = 0,0731$. Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm^2)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa zilustrowano na rycinie 23.



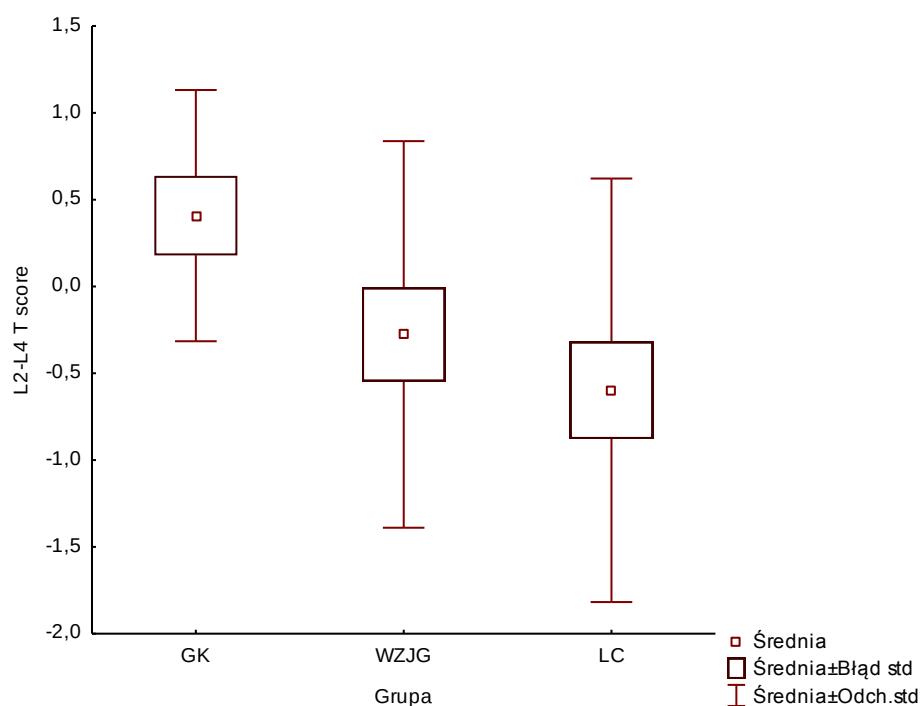
Rycina 23. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm^2)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa.

Pacjenci z badanych grup będący heterozygotami Aa istotnie statystycznie różnili się T score SKU ($p < 0,05$). Porównania szczegółowe wykazały, że heterozygoty Aa z grupy LC miały istotnie statystycznie niższy T score SKU niż heterozygoty Aa z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Ponadto wartość p dla różnicy między WZJG a grupą kontrolną była bliska wartości 0,05 i wynosiła $p = 0,0530$. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa przedstawiono graficznie na rycinie 24.



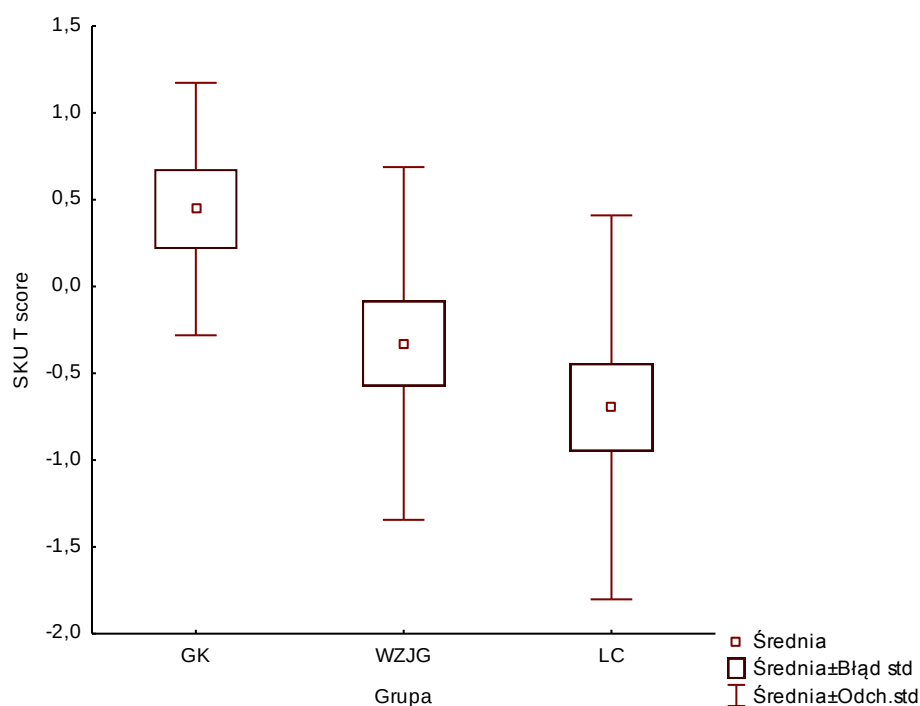
Rycina 24. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa.

W przypadku L2-L4 BMD różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami aa z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0731$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0714$). Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami aa z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score L2-L4 ($p<0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotą aa mieli istotnie statystycznie niższy T score L2-L4 niż homozygoty aa z grupy kontrolnej ($p<0,05$). T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa zilustrowano na rycinie 25.



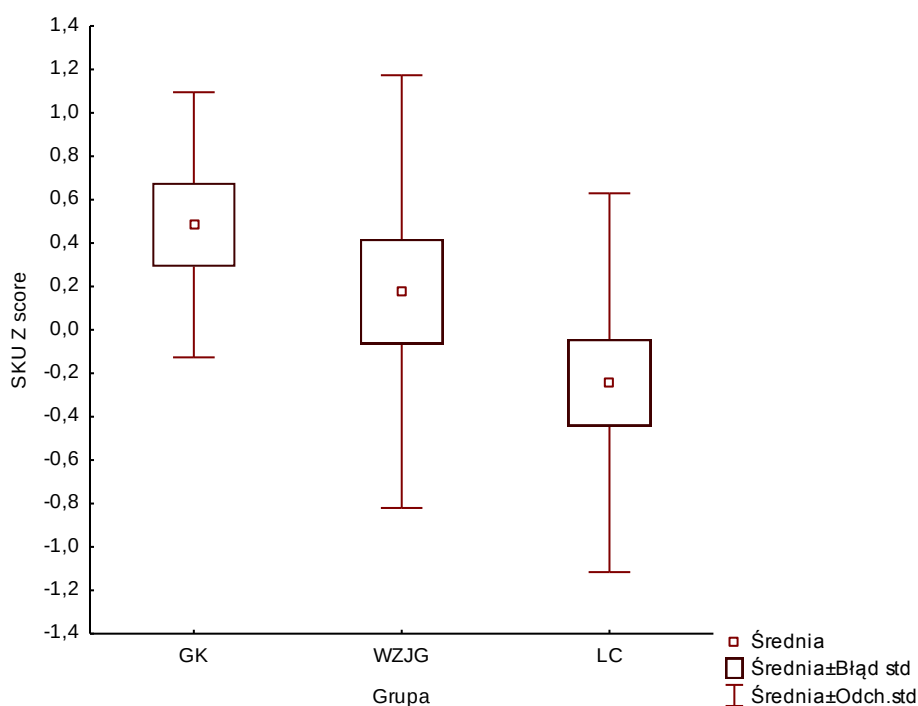
Rycina 25. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa.

Pacjenci z badanych grup będący homozygotami aa istotnie statystycznie różnili się pod względem T score SKU ($p < 0,05$). Porównania szczegółowe wykazały, że homozygoty aa z grupy LC miały istotnie statystycznie niższy T score SKU niż homozygoty aa z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa przedstawiono graficznie na rycinie 26.



Rycina 26. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa.

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami aa z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem Z score SKU ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotą aa mieli istotnie statystycznie niższy Z score SKU niż homozygoty aa z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Z score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU Z score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa zilustrowano na rycinie 27.



Rycina 27. Z score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU Z score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Lesniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa.

W badanych grupach wśród osób z różnymi wariantami polimorfizmu ApaI genu *VDR* nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia witaminy D.

4.17 Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C)

W tabeli 25 przedstawiono porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C).

Tabela 25. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C).

Parametr	TaqI			
	TT			
	LC (n=28)	WZJG (n=43)	GK (n=11)	<i>p</i>

L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,11 + 0,19 ¹	1,15 + 0,12	1,25 + 0,09	p=0,0090 *p=1,0000 **p=0,0072 ***p=0,0449
L2-L4 T score	-0,87 + 1,45	-0,55 + 1,09	0,32 + 0,66	p=0,0044 *p=0,9399 **p=0,0032 ***p=0,0345
L2-L4 Z score	-0,44 + 1,41	-0,21 + 1,26	0,34 + 0,51	p=0,0848 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,94 + 0,15	0,97 + 0,14	1,04 + 0,12	p=0,1153 (ns)
SKU T score	-0,71 + 1,00	-0,36 + 1,02	0,28 + 0,76	p=0,0157 *p=1,0000 **p=0,0124 ***p=0,0863
SKU Z score	-0,30 + 0,82	0,01 + 0,99	0,31 + 0,66	p=0,0820 (ns)
25 OHD (ng/ml)	20,04 + 12,44	23,60 + 10,48	21,44 + 7,11	p=0,3645 (ns)
Parametr	Tt			
	LC (n=31)	WZJG (n=36)	GK (n=23)	<i>p</i>
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,12 + 0,18	1,15 + 0,16	1,20 + 0,07	p=0,1619 (ns)
L2-L4 T score	-0,85 + 1,44	-0,52 + 1,36	-0,13 + 0,68	p=0,0845 (ns)
L2-L4 Z score	-0,44 + 1,26	-0,24 + 1,32	-0,11 + 0,70	p=0,5172 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,95 + 0,19	0,95 + 0,16	1,10 + 0,18	p=0,0028 *p=1,0000 **p=0,0052 ***p=0,0066
SKU T score	-0,66 + 1,36	-0,49 + 1,30	0,53 + 1,19	p=0,0020 *p=1,0000 **p=0,0024 ***p=0,0090
SKU Z score	-0,28 + 1,14	-0,06 + 1,15	0,46 + 1,18	p=0,0651 *p=1,0000 **p=0,0599

				***p=0,03041
25 OHD (ng/ml)	21,95 + 11,47	20,97 + 8,77	22,04 + 10,65	p=0,9937 (ns)
Parametr	tt			
	LC (n=14)	WZJG (n=20)	GK (n=3)	p
L2-L4 BMD (g/cm ²)	1,15 + 0,19	1,21 + 0,13	1,31 + 0,04	p=0,0668 *p=0,5673 **p=0,0752 ***p=0,3541
L2-L4 T score	-0,61 + 1,61	-0,23 + 0,78	0,80 + 0,30	p=0,0596 *p=1,0000 **p=0,0541 ***p=0,1773
L2-L4 Z score	-0,23 + 1,40	-0,03 + 0,78	0,54 + 0,52	p=0,2521 (ns)
SKU BMD (g/cm ²)	0,96 + 0,19	1,05 + 0,12	1,03 + 0,14	p=0,2558 (ns)
SKU T score	-0,52 + 1,58	0,10 + 0,94	0,12 + 0,81	p=0,2586 (ns)
SKU Z score	-0,17 + 1,41	0,37 + 0,86	0,10 + 0,62	p=0,1878 (ns)
25 OHD (ng/ml)	22,62 + 15,07	21,63 + 8,22	18,34 + 2,86	p=0,7953 (ns)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna, WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, GK: grupa kontrolna, L2-L4: odcinek lędźwiowy kręgosłupa, SKU: koniec bliższy szyjki kości udowej, BMD: gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)

ns: non-significant, vs: versus

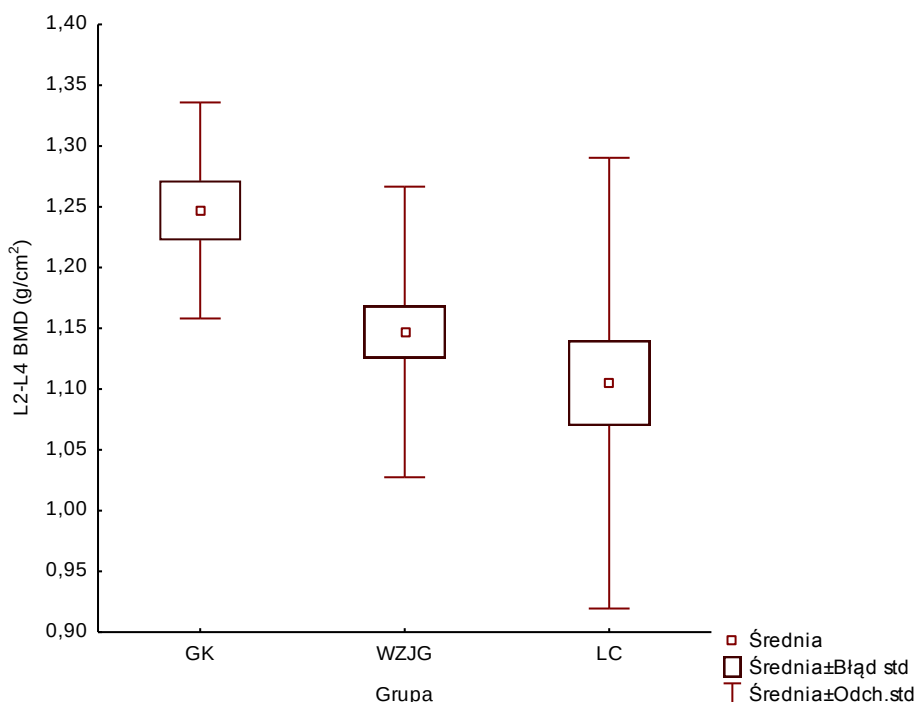
¹ Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi

Liczba gwiazdek oznacza grupy zawarte w porównaniu, następująco:

* LC vs WZJG, ** LC vs grupa kontrolna, *** WZJG vs grupa kontrolna

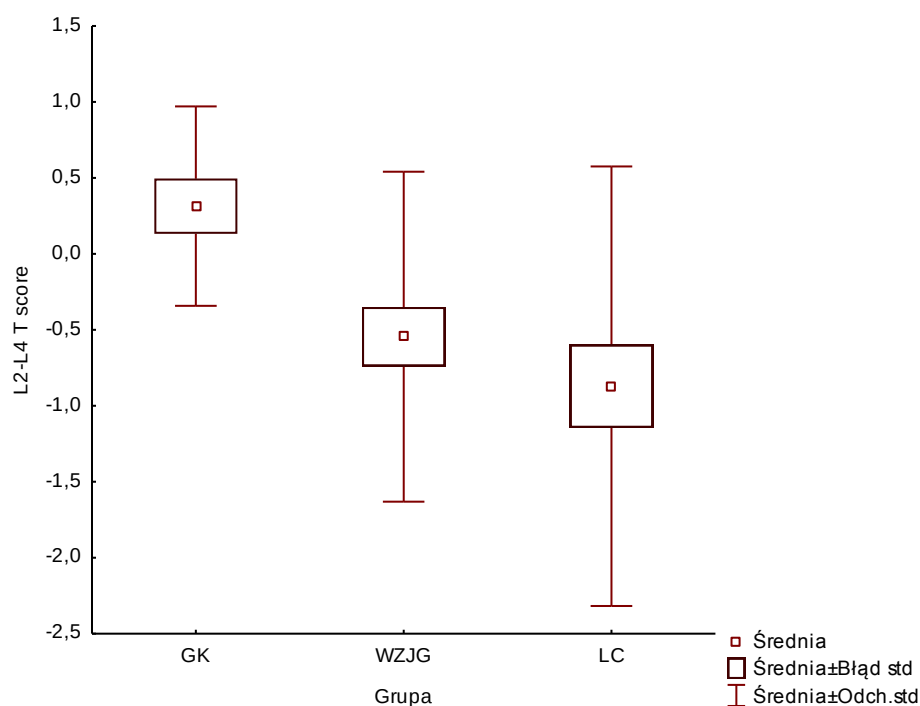
Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami TT z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem gęstości mineralnej kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa ($p < 0,01$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotami TT mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa od pacjentów homozygot TT z grupy kontrolnej ($p < 0,01$), pacjenci z grupy WZJG będący homozygotą TT mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa niż pacjenci z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Gęstość mineralną odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm²) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita

grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT przedstawiono graficznie na rycinie 28.



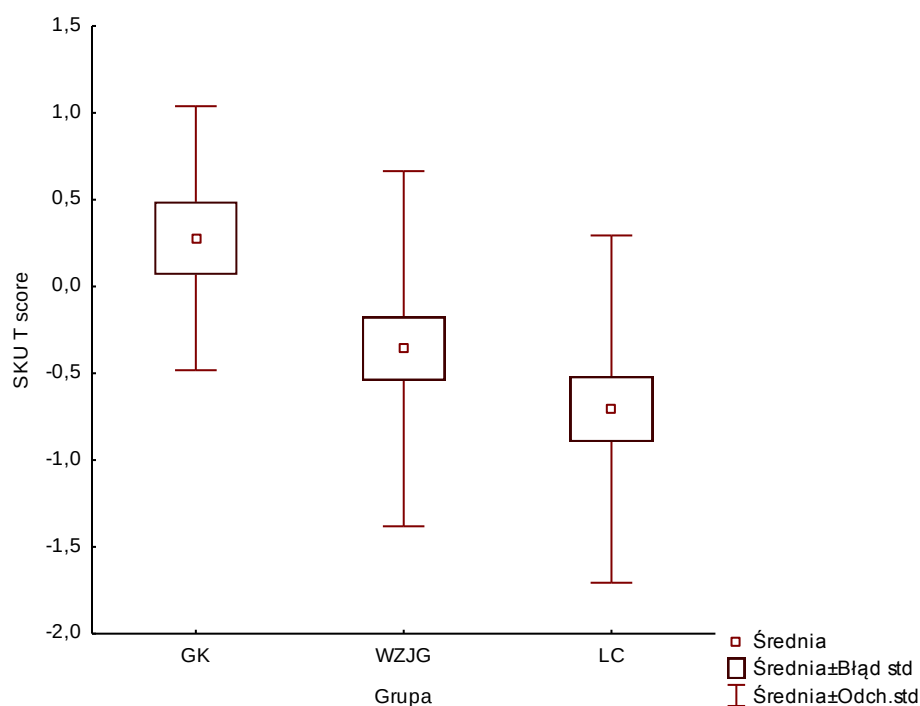
Rycina 28. Gęstość mineralna kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT.

Pacjenci z badanych grup będący homozygotami TT istotnie statystycznie różnili się T score L2-L4 ($p < 0,01$). W porównaniach szczegółowych wykazano, że pacjenci z LC mieli istotnie niższy T score L2-L4 niż osoby z grupy kontrolnej ($p < 0,01$), pacjenci z grupy WZJG będący homozygotą TT mieli istotnie statystycznie niższy T score L2-L4 niż pacjenci z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT zilustrowano na rycinie 29.



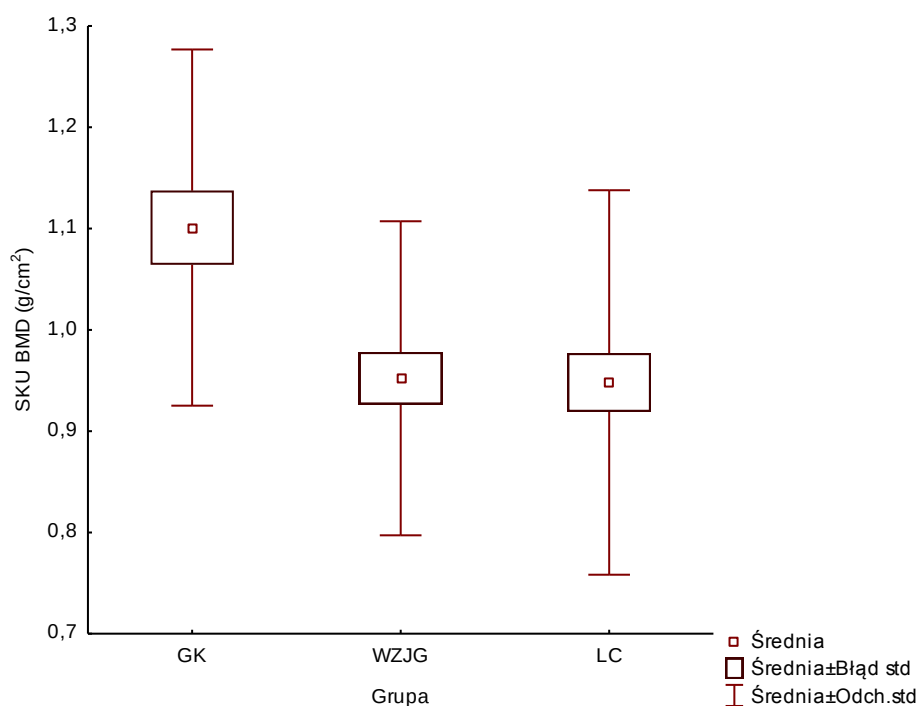
Rycina 29. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT.

Odnutowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami TT z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score SKU ($p < 0,05$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący homozygotą TT mieli istotnie statystycznie niższy T score SKU niż homozygoty z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT przedstawiono graficznie na rycinie 30.



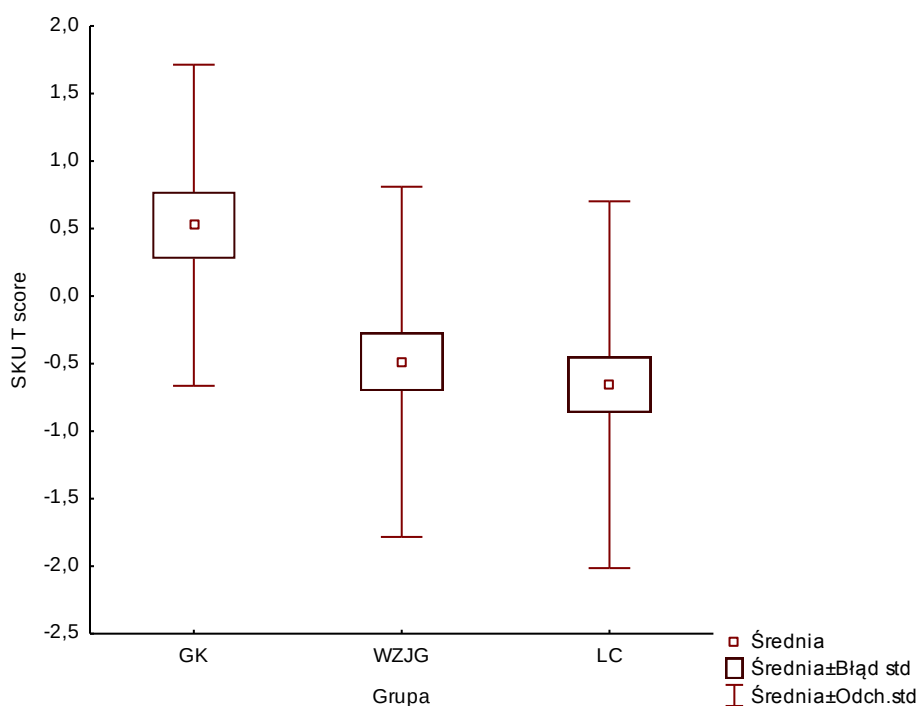
Rycina 30. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT.

Pacjenci z badanych grup będący heterozygotami Tt istotnie statystycznie różnili się gęstością mineralną bliższego końca szyjki udowej ($p < 0,01$). Porównania szczegółowe wykazały, że heterozygoty Tt z grupy LC miały istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną SKU niż heterozygoty Tt z grupy kontrolnej ($p < 0,01$), pacjenci heterozygoty Tt z grupy WZJG mieli istotnie statystycznie niższą gęstość mineralną SKU niż heterozygoty Tt z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt zilustrowano na rycinie 31.



Rycina 31. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm²) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt.

Odnotowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Tt z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) pod względem T score SKU ($p < 0,01$). Analiza porównań wielokrotnych wykazała, że pacjenci z grupy LC będący heterozygotami Tt mieli istotnie statystycznie niższy T score SKU niż heterozygoty Tt z grupy kontrolnej ($p < 0,01$), heterozygoty Tt z grupy WZJG miały statystycznie istotnie niższy T score SKU niż osoby z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). W przypadku SKU Z score różnica pomiędzy pacjentami będącymi heterozygotami Tt z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p = 0,0651$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p = 0,0599$). T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt przedstawiono graficznie na rycinie 32.

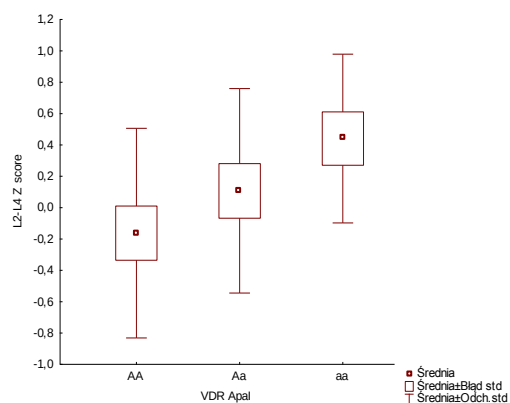


Rycina 32. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt.

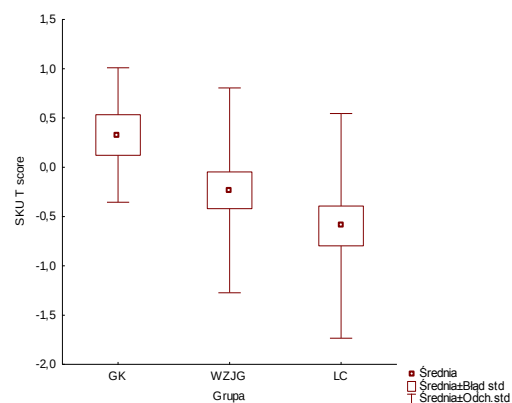
W przypadku BMD L2-L4 różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami tt z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0668$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0752$). Ponadto w przypadku L2-L4 T score różnica pomiędzy pacjentami będącymi homozygotami tt z badanych grup (LC, WZJG, grupa kontrolna) nie uzyskała istotności statystycznej na poziomie 0,05, jednak wartość p była bliska zakładanej istotności statystycznej i wynosiła $p=0,0596$. W porównaniach szczegółowych różnice także nie uzyskały istotności statystycznej, jednak różnica pomiędzy pacjentami z LC i z grupy kontrolnej uzyskała wartość p bliską 0,05 ($p=0,0541$).

W badanych grupach wśród osób z różnymi wariantami polimorfizmu TaqI genu VDR nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia witaminy D.

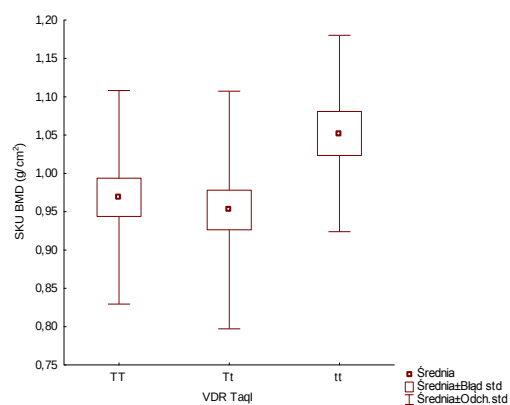
4.18 Graficzne podsumowanie międzygrupowych porównań analizowanych zmiennych ilościowych (podrozdziały 4.12-4.17)



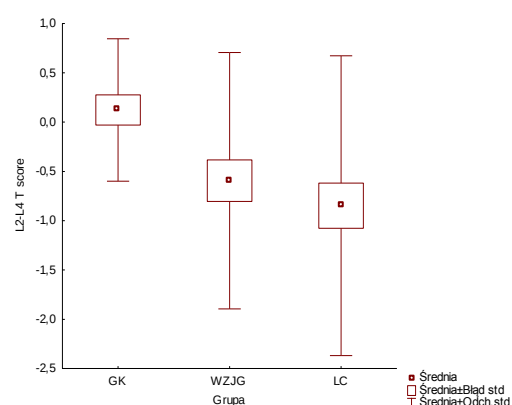
Rycina 8.¹ (aa vs AA: $p < 0,05$)



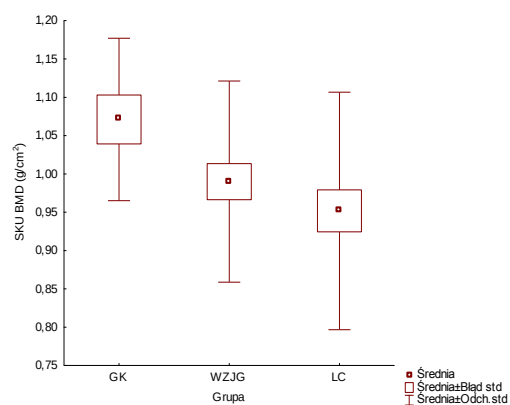
Rycina 11. (FF: LC vs GK: $p < 0,05$)



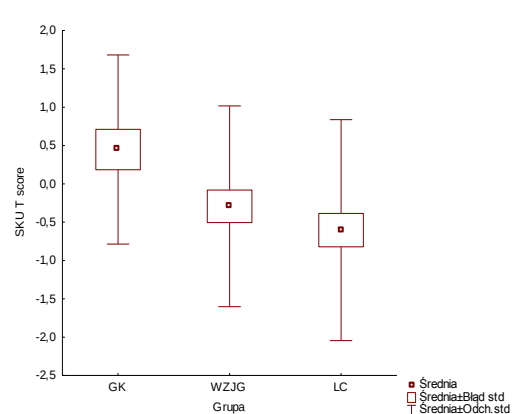
Rycina 9. (tt vs Tt: $p < 0,05$)



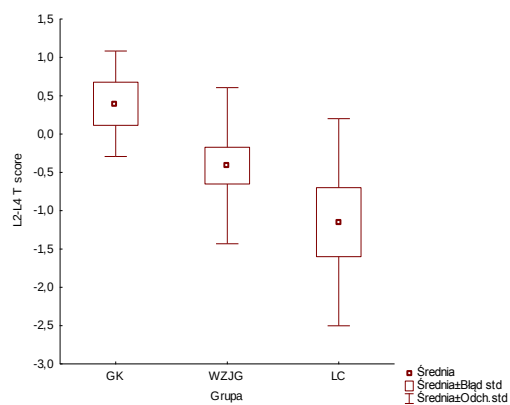
Rycina 12. (Ff: LC vs GK: $p < 0,05$)



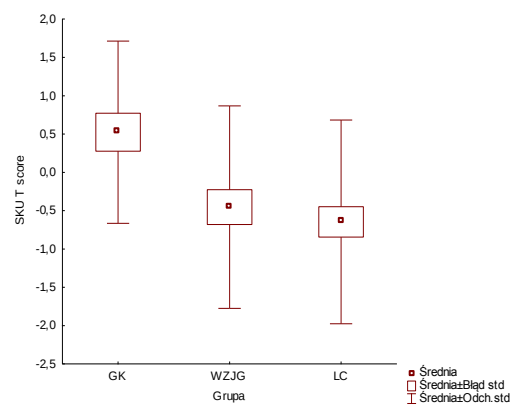
Rycina 10. (FF: LC vs GK: $p < 0,05$)



Rycina 13. (Ff: LC vs GK: $p < 0,05$)

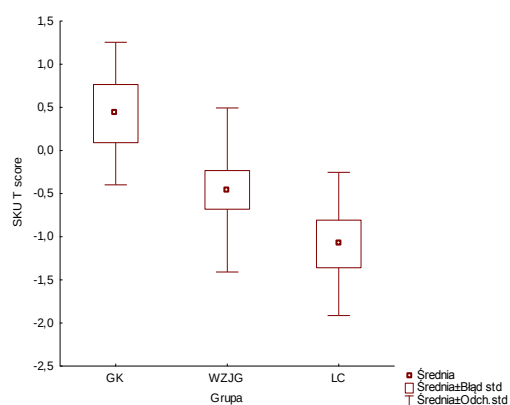


Rycina 14. (ff: LC vs GK: $p < 0,05$)

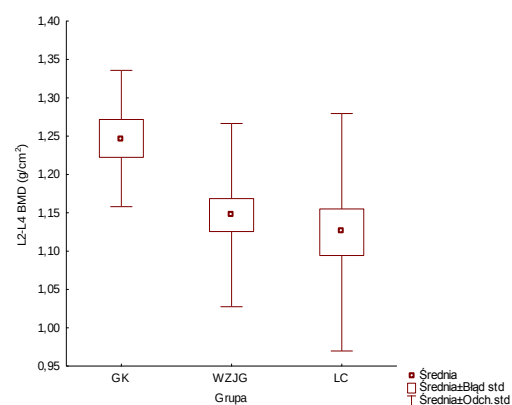


Rycina 17. (Bb: LC vs GK: $p < 0,01$)

(Bb: WZJG vs GK: $p < 0,05$)

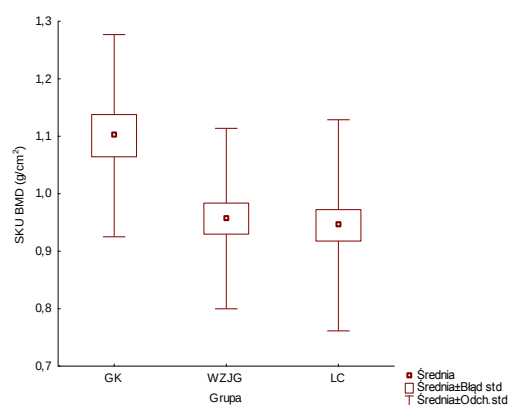


Rycina 15. (ff: LC vs GK: $p < 0,05$)



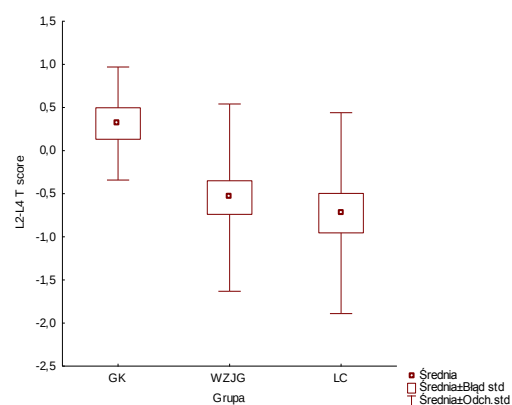
Rycina 18. (bb: LC vs GK: $p < 0,05$)

(bb: WZJG vs GK: $p < 0,05$)



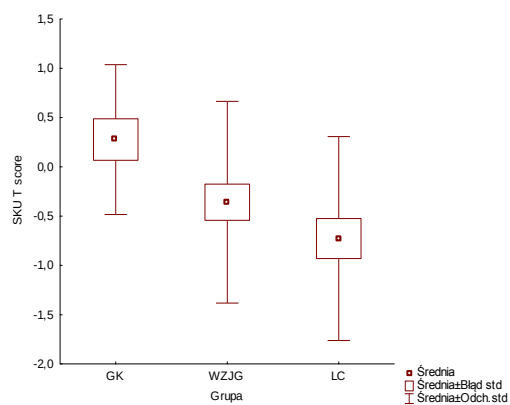
Rycina 16. (Bb: LC vs GK: $p < 0,01$)

(Bb: WZJG vs GK: $p < 0,01$)

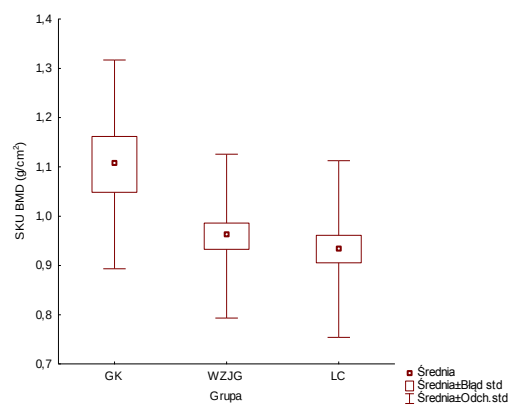


Rycina 19. (bb: LC vs GK: $p < 0,01$)

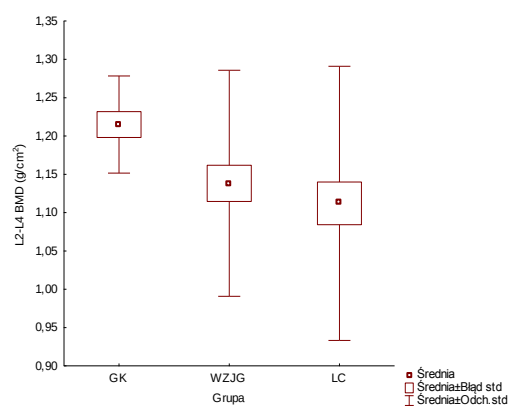
(bb: WZJG vs GK: $p < 0,05$)



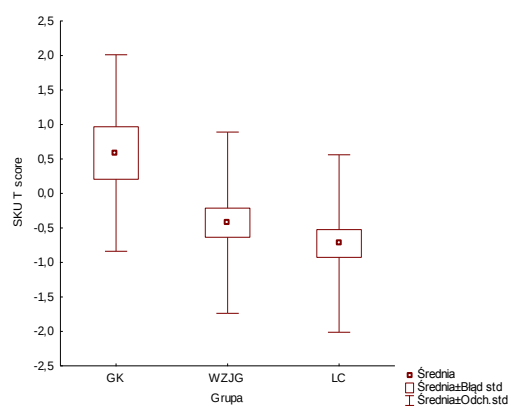
Rycina 20. (bb: LC vs GK: $p < 0,05$)



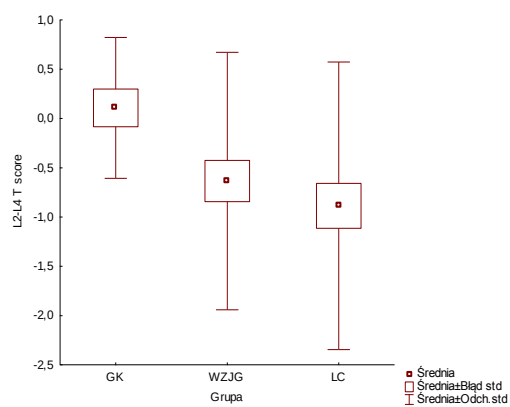
Rycina 23. (Aa: LC vs GK: $p < 0,05$)



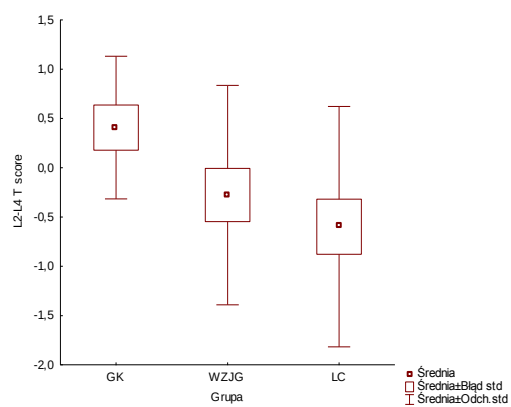
Rycina 21. (Aa: LC vs GK: $p < 0,05$)



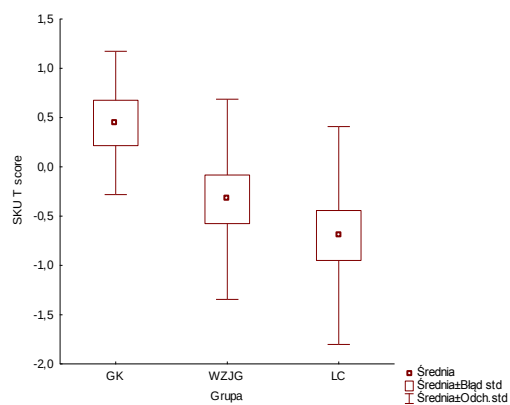
Rycina 24. (Aa: LC vs GK: $p < 0,01$)



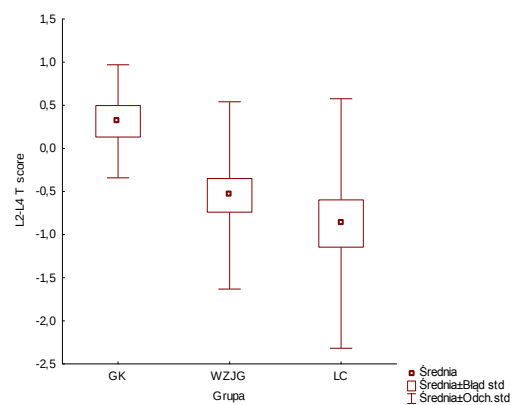
Rycina 22. (Aa: LC vs GK: $p < 0,05$)



Rycina 25. (aa: LC vs GK: $p < 0,05$)

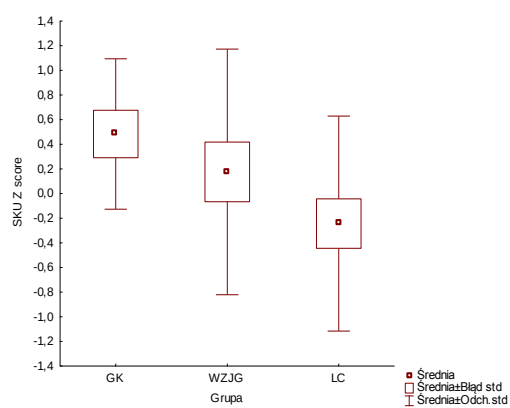


Rycina 26. (aa: LC vs GK: $p<0,05$)

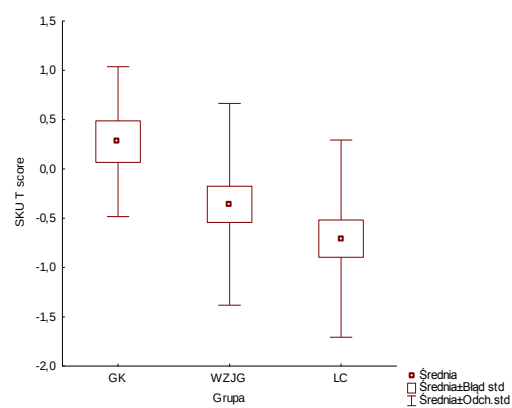


Rycina 29. (TT: LC vs GK: $p<0,01$)

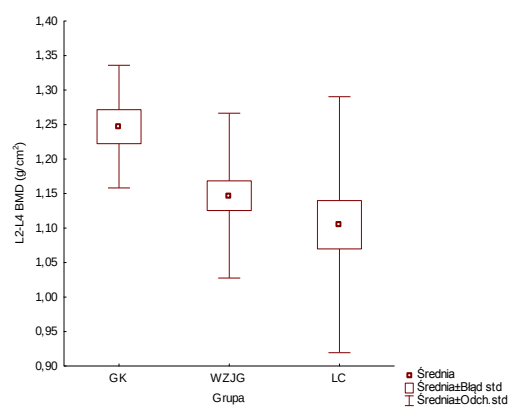
(TT: WZJG vs GK: $p<0,05$)



Rycina 27. (aa: LC vs GK: $p<0,05$)

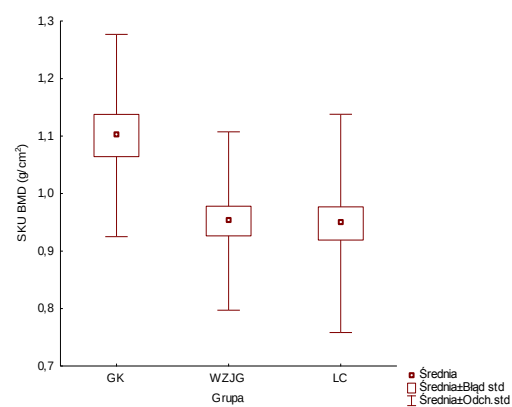


Rycina 30. (TT: LC vs GK: $p<0,05$)



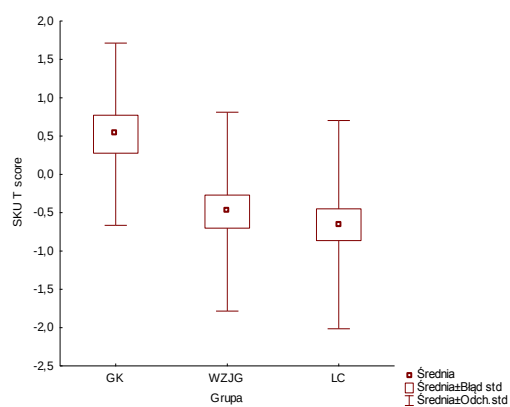
Rycina 28. (TT: LC vs GK: $p<0,01$)

(TT: WZJG vs GK: $p<0,05$)



Rycina 31. (Tt: LC vs GK: $p<0,01$)

(Tt: WZJG vs GK: $p<0,01$)



Rycina 32. (Tt: LC vs GK: $p < 0,01$)

(Tt: WZJG vs GK: $p < 0,01$)

LC: choroba Leśniowskiego-Crohna; WZJG: wrzodziejące zapalenie jelita grubego;
GK: grupa kontrolna; vs: *versus*

¹ numeracja rycin jak w podrozdziałach 4.12 – 4.17

5. Dyskusja

5.1 Wprowadzenie

Współczesna diagnostyka molekularna ukierunkowana jest na poszukiwanie polimorfizmów odpowiedzialnych za rozwój chorób o niezwykle skomplikowanym, wieloczynnikowym podłożu, do jakich należy osteoporoza. Trudność w oszacowaniu genetycznych podstaw tego schorzenia stanowi uwarunkowany wielogenowo fenotyp, podlegający dodatkowo modyfikacji przez silny wpływ wielu czynników środowiskowych. Oznacza to, że pojedyncze polimorfizmy genów zaangażowanych w metabolizm tkanki kostnej wywierają niewielki wpływ na fenotyp i dopiero wspólny efekt niekorzystnych zmian w wielu genach jest widoczny, a dodatkowo nie pozostaje on obojętny wobec ingerencji ze strony czynników środowiskowych, takich jak dieta, styl życia i czynników hormonalnych. Dlatego też genotyp predysponujący do osteoporozy nie decyduje jeszcze o jej wystąpieniu.

Nie ma jednoznacznego spojrzenia na badania genetyczne w osteoporozie. W wielu metaanalizach (Zintzaras, Uitterlinden) jedynym pewnym wnioskiem jest wskazanie, że różne populacje mogą się w tym zakresie istotnie różnić [188].

Niniejsza praca skupiała się na strukturze zaopatrzenia w witaminę D, analizie gęstości mineralnej kości u chorych z NChZJ oraz wykonaniu analiz dla 4 polimorfizmów jednego genu, którego produkt białkowy jest istotnie zaangażowany w metabolizm tkanki kostnej. Gen i polimorfizmy zostały wybrane w oparciu o dostępne dane literaturowe. Gen receptora witaminy D (VDR) był jednym z pierwszych genów badanych w aspekcie wpływu na rozwój osteoporozy [189]. W organizmie człowieka aktywna forma witaminy D odpowiedzialna jest głównie za utrzymanie homeostazy wapnia. Witamina D₃ pobudza także produkcję kolagenu i białek takich jak osteopontyna czy osteokalcyna uczestniczących w mineralizacji macierzy kostnej. Aby witamina D mogła pełnić swe funkcje konieczne jest jej przyłączenie do specyficznego receptora steroidowego o aktywności czynnika transkrypcyjnego. Receptor witaminy D w kompleksie z witaminą D powoduje aktywację bądź wyciszenie ekspresji genów docelowych, przez co wpływa na proces syntezy białek biorących czynny udział w metabolizmie kości i utrzymaniu homeostazy wapniowej. Wszelkie zmiany w genie receptora witaminy D mogą przekładać się na zmiany białka VDR, jego strukturę, funkcję, aktywność a zatem będą wpływały na czynnik transkrypcyjny pośredniczący w przekazywaniu sygnału od witaminy D do poziomu genów białek pozostających pod jej pośrednią kontrolą. Zarówno witamina D jak i cztery główne polimorfizmy genu VDR (FokI, BsmI, ApaI, TaqI)

od wielu lat cieszą się ciągłym zainteresowaniem zespołów naukowych z całego świata, przynosząc znamienne wyniki w jednych populacjach, a w drugich dając wyniki skrajnie różne [190].

Prezentowaną dyskusję skonstruowano adekwatnie do treści przedstawionych w wynikach badań.

5.2 Porównanie grupy badanych chorych i grupy kontrolnej

Grupę badaną stanowiło 172 chorych, w tym 85 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) i 87 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) w młodym wieku, co jest charakterystyczne dla nieswoistych chorób zapalnych jelit. Ryzyko wystąpienia zaburzeń stanu odżywienia wśród pacjentów z chorobami zapalnymi jelit szacuje się na 20-70% [191, 192]. Niedożywienie u chorych z IBD może wynikać z: niedostatecznej podaży składników odżywczych, zaburzeń wchłaniania, zwiększenia utraty składników odżywczych ze stolcem oraz zwiększonego zapotrzebowania organizmu na energię. W przeprowadzonym przez nas badaniu zdrowi ochotnicy z grupy kontrolnej mieli wyższą masę ciała i wyższe BMI niż pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

5.3 Witamina D

5.3.1 Stężenie witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej

Analiza stanu zaopatrzenia organizmów chorych na NChZJ w 25(OH)D jest obiektem zainteresowania badaczy na przestrzeni ostatnich lat. Pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit stanowią grupę chorych szczególnie narażoną na niedobory witaminy D. Wśród głównych przyczyn deficytów witaminy D u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wymienia się zaburzenia jej wchłaniania i metabolizmu oraz mniejszą ekspozycję na światło słoneczne.

W przeprowadzonym badaniu średnie stężenie witaminy D w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna wynosiło 21,43 ng/ml, a w grupie chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego – 22,06 ng/ml i nie różniło się istotnie od średniego stężenia w grupie kontrolnej – 21,56 ng/ml ($p < 0,05$). Zwraca uwagę szczególnie wysoki odsetek pacjentów we wszystkich grupach z deficytem witaminy D definiowanym jako stężenie poniżej 20 ng/ml, w grupie chorych z LC wynosił on 49,41%, w grupie chorych z WZJG 44,83%, natomiast w grupie kontrolnej 48,72%. Optymalne stężenie witaminy D (30-50 ng/ml) odnotowano zaledwie u 15,29% chorych z LC, 17,24% chorych z WZJG i u 12,82% osób z grupy kontrolnej.

Podobne obserwacje wskazujące na niedobory witaminy D przedstawiono w wielu opublikowanych na całym świecie doniesieniach.

Według Hassana i wsp. stężenie witaminy D poniżej 30 ng/ml występuje u 95% badanych pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, natomiast z danych opublikowanych przez Ananthakrishnana i wsp. wynika, że 32% chorych miało stężenie witaminy D poniżej 20 ng/ml [156, 193].

Metaanaliza Lu i współautorów, która ukazała się w 2015 roku dotyczyła 13 badań klinicznych, w których oceniano poziom 25(OH)D u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, w 8 z powyższych badań analizowano także poziom witaminy D u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Wykazano, że pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit mieli niższe stężenie 25(OH)D niż osoby z grupy kontrolnej. Pacjenci z ChLC mieli blisko 2-krotnie, a pacjenci z WZJG ponad 2-krotnie wyższe ryzyko niedoboru witaminy D w porównaniu do grupy kontrolnej [194].

Kolejna metaanaliza powstała pod kierunkiem Del Pinto i wsp. i dotyczyła 14 badań klinicznych analizujących 1891 badanych, w tym 938 chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit i 953 osób z grupy kontrolnej. Przegląd badań wykazał, że u pacjentów z NChZJ występowały 64% większe odsetki niedoboru witaminy D w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast u pacjentów z WZJG stwierdzono ponad dwukrotnie większe ryzyko niedoboru witaminy D w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej [195].

Niskie stężenie witaminy D częściej opisywano u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, a niedobory stwierdzono u blisko 70% pacjentów [196]. Podobnych obserwacji dokonali Fu i wsp. – 43% badanych z ChLC miało poziom witaminy D <50nmol/l, podczas gdy równie niski poziom występował u 37% pacjentów z WZJG [197]. Również badanie Kuwabary i wsp. zwraca uwagę na istotnie niższe poziomy witaminy D w grupie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (średnia 11 ng/ml) w porównaniu do chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (średnio 20 ng/ml) [198]. W prezentowanym badaniu średni poziom witaminy D u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna nie różnił się istotnie od poziomu witaminy D u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i od badanych z grupy kontrolnej. Podobnych obserwacji u japońskich pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu do grupy kontrolnej dokonali Tajika i wsp [199]. Analogicznie w badaniu Suibhane i wsp. również nie odnotowano różnicy w średnim stężeniu witaminy D w grupie chorych i zdrowych osób [200].

Hipowitaminoza D wydaje się być zjawiskiem epidemicznym nie tylko wśród pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Według najnowszych badań niedobory witaminy D są zjawiskiem powszechnym także w populacji osób zdrowych na całym świecie [201]. Wśród głównych czynników ryzyka wymienia się wiek, płeć żeńską, ciemniejszą pigmentację skóry, czynniki wpływające na ekspozycję słoneczną, sposób ubierania się i nawyki żywieniowe.

W metaanalizie Hilgera i wsp. z 2014 roku uwzględniono 195 badań, w których udział wzięło 168 tysięcy osób z 44 krajów świata. Większość z analizowanych badań przeprowadzono w Europie, Azji i rejonie Pacyfiku oraz w Ameryce Północnej. Wykazano, że 88,1 % badanych osób miało średni poziom witaminy D niższy niż 30 ng/ml, 37,3% badanych miało średnie poziomy witaminy D poniżej 20 ng/ml a u 6,7% uczestników średni poziom witaminy D wynosił poniżej 10 ng/ml [89]. W prezentowanym badaniu odsetek niedoboru witaminy D definiowany jako stężenie poniżej 20 ng/ml występował u 48,72% zdrowych osób z grupy kontrolnej, a więc był wyższy niż w prezentowanej metaanalizie. W Stanach Zjednoczonych niedobór witaminy D (25(OH)D poniżej 20 ng/ml) odnotowano u 36% zdrowych osób w wieku 18-29 lat i u blisko 42% zdrowych czarnoskórych kobiet w wieku 15-49 lat [90].

W badaniach, w których udział wzięły osoby mieszkające w krajach o wysokim stopniu nasłonecznienia, takich jak Arabia Saudyjska, Zjednoczone Emiraty Arabskie, Australia, Turcja, Indie i Liban u 30-50% osób także stwierdzono znaczny niedobór witaminy D [202].

Podobnych obserwacji dokonano w populacji Europy Środkowej. W okresie zimowym średnie stężenia witaminy D wahały się od 11 ng/ml w Polsce do 18 ng/ml w Estonii, natomiast w okresie letnim zakres średnich stężeń wynosił od 18 ng/ml na Ukrainie do 35 ng/ml na Węgrzech. Średnie roczne stężenie 25(OH)D wynosiło od 14 ng/ml w populacji ukraińskiej do 29 ng/ml w populacji Białorusi [203].

Badanie Płudowskiego i wsp. będące największym dotyczącym witaminy D badaniem przeprowadzonym na populacji polskiej potwierdza dużą skalę niedoborów 25 (OH)D. Analizie poddano 5775 dorosłych z różnych miast Polski, średnie stężenie witaminy D wynosiło 18,0 ng/ml, a deficyt witaminy D stwierdzono u 65,8% badanych. Na wzrost ryzyka niedoboru istotnie wpływały płeć, wiek i wyższa masa ciała [204].

W przeprowadzonym badaniu średnie stężenie witaminy D w grupie kontrolnej, czyli wśród osób zdrowych wynosiło 21,56 ng/ml. Deficyt witaminy D definiowany jako stężenie poniżej 20 ng/ml odnotowano u 48,72% zdrowych osób. Optymalne stężenie witaminy D (30-50 ng/ml) odnotowano zaledwie u 12,82% osób z grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki zdają się być alarmujące i potwierdzają skalę światowego problemu niedoborów witaminy D. Na niskie poziomy witaminy D w populacji polskiej wpływa położenie geograficzne Polski warunkujące niski kąt padania promieni słonecznych oraz ogólny czas nasłonecznienia, jednakże niedobory występują także w krajach o niższej szerokości geograficznej, gdzie dociera większa ilość promieniowania UVB. Niedobory warunkuje także styl życia związany z przebywaniem w pomieszczeniach, zasłanianiem ciała i stosowaniem filtrów przeciwsłonecznych [201]. Do ważnych czynników ryzyka niedoborów witaminy D w populacji ogólnej należy także nieodpowiednia dieta, uboga w produkty bogate w witaminę D.

Szczególnie zastanawiający jest fakt, że nie zaobserwowano istotnej różnicy między badanymi grupami pacjentów a grupą kontrolną – zarówno u zdrowych i chorych poziom witaminy D był niski. Trudno jednoznacznie zinterpretować otrzymany wynik. Być może zjawisko to jest związane z niskim poziomem witaminy D w populacji ogólnej.

Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że często porównanie różnych badań dotyczących stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D może narażać na trudności ze względu na różnice w projektach badawczych – zwłaszcza metod oznaczania witaminy D, szerokościach geograficznych krajów, które brały udział w badaniach, wieku włączonych do badań pacjentów [205]. Jednakże wnioski płynące z aktualnie publikowanych doniesień oraz przeprowadzonego badania pozostają spójne co do szerokiego spektrum niedoborów 25(OH)D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i wśród zdrowej populacji.

5.3.2 Witamina D a cechy morfologiczne

W grupie ryzyka niedoborów witaminy D znajdują się osoby zamieszkujące rejony o niedostatecznym nasłonecznieniu lub unikające ekspozycji na światło słoneczne, osoby niedożywione, starsze i otyłe.

Współwystępowanie niskiego stężenia witaminy D oraz otyłości zostało potwierdzone w wielu badaniach, ciągle jednak mechanizmy, które odpowiadają za ten proces pozostają niewyjaśnione [206, 207].

W badaniu Pallav i wsp., w którym udział wzięło 237 pacjentów z potwierdzoną nieswoistą chorobą zapalną jelita leczonych w Medycznym Centrum Uniwersyteckim w Mississippi (USA) odnotowano istotną zależność między BMI chorych a poziomem witaminy D w surowicy. Ponadto pacjenci z BMI <25 kg/m² mieli w większości wystarczający poziom zaopatrzenia w witaminę D, podczas gdy odsetek chorych z niedoborem witaminy D był wysoki wśród chorych z BMI >30 kg/m², a więc chorych otyłych [208]. Przyczyn takiego zjawiska upatruje się w teorii sekwestracji, czyli zgromadzenia witaminy D w tkance tłuszczowej, co potwierdzają badania Worstmana i wsp, Rosenstreicha i wsp. oraz Bluma i wsp. [111, 209, 210].

W raporcie autorstwa Lim i wsp., oceniającym stan odżywienia i gęstość mineralną kości u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego istotnie niższe stężenie witaminy D odnotowano u chorych niedożywionych z niższą masą ciała [211].

Natomiast w niniejszym opracowaniu nie odnotowano związku między stężeniem witaminy D a masą ciała i BMI chorych oraz zdrowych osób z grupy kontrolnej. Można to wiązać z tym, że w grupach badanych średnie wartości BMI mieściły się w przedziale wartości uznanych za normę, a średnie masy ciała chorych z poszczególnych grup były zbliżone oraz tym, że nie odnotowano różnic w poziomach witaminy D w poszczególnych grupach.

Istotnym czynnikiem ryzyka niedoboru witaminy D jest wiek. U osób starszych skuteczność skórnej syntezy witaminy D spada o 75% w porównaniu do osób młodych, częściej też starszy wiek wiąże się z mniejszą ekspozycją na światło słoneczne i pozostawianiem w zamkniętych pomieszczeniach [212, 213, 214].

W badaniu przeprowadzonym przez Ulitsky'ego i wsp. na grupie ponad 500 chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit odnotowano istotną zależność – pacjenci z deficytem witaminy D byli na ogół starsi niż chorzy z optymalnym zaopatrzeniem organizmu w witaminę D (44,6 vs 40,6 lat, p=0,004) [215].

W prezentowanym badaniu nie zaobserwowano związku między stężeniem witaminy D a wiekiem chorych oraz zdrowych osób z grupy kontrolnej, co może wynikać z młodego wieku uczestników badania – w żadnej z grup średni wiek nie przekraczał 40 lat oraz z braku różnic między średnimi poziomami witaminy D w poszczególnych grupach badanych.

Niewątpliwie niedobór witaminy D w populacji starszych osób i otyłych jest powszechny. Konieczne wydaje się prowadzenie badań w celu jak najpełniejszej oceny niedoborów witaminy D w różnych grupach wiekowych oraz u chorych z różnym wskaźnikiem masy ciała wśród pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, co umożliwi identyfikowanie wśród pacjentów z IBD osób szczególnie narażonych na niekorzystne skutki deficytu witaminy D oraz przyczyni się do właściwego leczenia chorych.

5.3.3 Witamina D a gęstość mineralna kości

Zaburzenia gęstości mineralnej kości u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit są istotnym problemem klinicznym, znacznie obniżają jakość życia chorych oraz przyczyniają się do obniżenia ogólnej sprawności. Wśród przyczyn osteopenii i osteoporozy u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wymienia się reakcję zapalną i działanie cytokin prozapalnych, które mogą hamować osteoblasty, stosowanie glikokortykosteroidów oraz niedobór witaminy D. Witamina D jako hormon działający na różne populacje komórek kostnych oraz czynnik regulujący gospodarkę wapniowo-fosforanową zapewnia prawidłowe funkcjonowanie tkanki kostnej.

W wielu badaniach potwierdzono związek niskiego poziomu witaminy D z niską gęstością mineralną kości [216, 217]. W badaniu Bischoff-Ferrari i wsp. wykazano istotną dodatnią korelację między poziomem 25OHD a gęstością mineralną kości u młodszych i starszych mężczyzn rasy białej [216]. Jednakże nie wszystkie badania prowadzą do podobnych wniosków [218, 219]. Garnerio i wsp. w badaniu OFELY (Os des Femmes de Lyon), w którym udział wzięło 669 kobiet po menopauzie nie wykazali związku witaminy D z masą kostną w tej grupie badanych [220]. Podobnych obserwacji dotyczących braku zależności między BMD kręgosłupa lędźwiowego, BMD szyjki kości udowej i witaminą D, na grupie 415 marokańskich kobiet w wieku 24-77 lat dokonał Allali i wsp [221]. Zależność ta u chorych z NChZJ budzi wiele kontrowersji.

W badaniu Ezzata i Hamdy znaleziono istotną dodatnią korelację między witaminą D a gęstością mineralną kości u Azjatów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, a przeprowadzona dodatkowo analiza regresji wykazała, że niedobór witaminy D jest istotnym czynnikiem ryzyka osteopenii i osteoporozy [222].

W badaniu Andreassena i wsp. przeprowadzonym na 115 pacjentach z chorobą Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano istotną zależność między poziomem witaminy D a BMD kości przedramienia [223].

W badaniu Mezquita Raya i wsp., w którym udział wzięli pacjenci zagrożeni wystąpieniem osteoporozy, w tym 61 chorych z rozpoznany nieswoistym zapaleniem jelit, odnotowano istotny związek między BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i szyjki kości udowej a poziomem witaminy D [136].

Vogelsang i wsp. wykazali u 31 chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna w wieku 17-75 lat istotny związek poziomu witaminy D z masą kostną kości przedramienia i odcinka lędźwiowego-kręgosłupa [224].

W badaniu polskim Krzesiek i wsp., w którym udział wzięło 67 dzieci w wieku od 5,5 roku do 18 lat bardzo małe stężenia witaminy D odnotowano u 55% chorych z NChZJ z jednocześnie obniżoną gęstością mineralną kości (53,3% dzieci – osteopenia, 60% dzieci – osteoporoza), co różniło się istotnie statystycznie w porównaniu z dziećmi chorującymi na nieswoiste choroby zapalne jelit ale mającymi prawidłowe BMD [225].

W niniejszym opracowaniu nie odnotowano związku między poziomem witaminy D a gęstością mineralną kości. Podobnych obserwacji u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit dokonał Jahnsen i wsp. oraz Silvennoinen i wsp. Badanie Jahnsena i wsp. dotyczyło 120 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna pochodzących z Norwegii a badanie Silvennoinena i wsp. 150 chorych z NChZJ pochodzących z Finlandii [99, 226].

Powyższy brak jednorodności w wynikach badań można tłumaczyć różnicami w badanych populacjach, odmiennym wiekiem badanych chorych a także faktem, że często badanie gęstości mineralnej kości dotyczyło różnych okolic ciała.

5.4 Gęstość mineralna kości

5.4.1 Gęstość mineralna kości u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit

W nieswoistych chorobach zapalnych jelit występuje zwiększone ryzyko rozwoju osteoporozy, a osobami szczególnie narażonymi na ubytek masy kostnej są chorzy z licznymi czynnikami ryzyka.

W niniejszym badaniu średnia gęstości mineralna kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa wynosiła $1,12 \pm 0,18 \text{ g/cm}^2$ u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i $1,16 \pm 0,14 \text{ g/cm}^2$ u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. 9,41% chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna miało osteoporozę a 38,82% osteopenię, natomiast w grupie chorych

na wrzodziejące zapalenie jelita grubego 2,3% miało osteoporozę a 34,48% osteopenię w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Średnia gęstości mineralna kości w szyjce kości udowej wynosiła $0,95 \pm 0,18 \text{ g/cm}^2$ u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i $0,98 \pm 0,15 \text{ g/cm}^2$ u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego. 5,88% chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna miało osteoporozę a 36,47% osteopenię, natomiast w grupie chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego 1,15% osób miało osteoporozę a 27,59% osteopenię w obrębie szyjki kości udowej.

W systematycznym przeglądzie piśmiennictwa dotyczącego gęstości masy kostnej u chorych z IBD, dokonany przez Bernsteina i wsp. wykazano obecność osteoporozy u 18-42% badanych, podczas gdy w badaniach, w których analizowano grupy liczących powyżej 60 osób odsetek ten wynosił 2-16% [50]. W metaanalizie podkreślono także istotny wpływ stosowania glikokortykosteroidów oraz aktywności choroby na gęstość kości. Wyniki dla dużych grup korespondują z wynikami uzyskanymi w niniejszej rozprawie.

W badaniu Bjarnasona i wsp. z 1997 roku analizującym BMD u chorych z nieswoistymi chorobami jelit, odnotowano wysoka częstość niskiej gęstości mineralnej kości. T score $< -1,0$ (osteopenia) zareportowano u 51-77% badanych, natomiast T score $< -2,5$ (osteoporoza) u 17-28% chorych. Badani chorzy mieli istotnie niższą gęstość mineralną kości mierzoną w szyjce kości udowej niż w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Wyniki powyższego badania różnią się od wyników uzyskanych w prezentowanej rozprawie – odsetek zaburzeń mineralizacji kości – zarówno osteopenii i osteoporozy jest znacznie wyższy w badaniu Bjarnasona, ponadto w prezentowanej dysertacji wykazano wyższy odsetek osteopenii i osteoporozy w odcinku lędźwiowym kręgosłupa niż w obrębie szyjki kości udowej [227].

W badaniu Pollaka i wsp., w którym przebadano 63 chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i 41 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego osteoporozę w odcinku lędźwiowym kręgosłupa wykazano u 42% chorych, natomiast osteopenię u 34% badanych. W szyjce kości udowej u 41% chorych odnotowano osteoporozę, a osteopenię wykazano u 42% chorych. Gęstość mineralna kości nie zależała od typu choroby i stosowania glikokortykosteroidów [228]. W prezentowanym badaniu odsetek chorych z osteoporozą był znacznie niższy, co może wiązać się z młodym wiekiem chorych – wiele z dostępnych publikacji podkreśla wiek zarówno u osób w populacji ogólnej jak również u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit jako silny czynnik ryzyka ubytku masy kostnej [229, 230, 231].

W badaniu Ezzata i Hamdy osteoporozę w odcinku lędźwiowym kręgosłupa wykazano u 50% chorych z Chorobą Leśniowskiego-Crohna i u 11,1% chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, natomiast osteopenię miało 41,6% chorych z CHLC i 22,2% z WZJG. Ograniczeniem badania wydaje się być mała liczba uczestników – przebadano 30 chorych, co może wpływać na duże różnice w ubytku masy kostnej w porównaniu do prezentowanego badania. Różnice dotyczą także badanych populacji – w badaniu Ezzata i wsp. grupę badaną stanowili Azjaci, co może wiązać się z cechami właściwymi danej populacji i odmienną podatnością na osteoporozę [222].

W wynikach badań prowadzonych na pacjentach z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, pochodzącymi z krajów arabskich oraz ze Sri Lanki również zwraca uwagę częste występowanie osteopenii i osteoporozy. Ismail i wsp. wykazali obecność osteoporozy u 30,5% badanych z IBD i obecność osteopenii u 44,2% badanych z IBD, zarówno w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i szyjce kości udowej. Odsetek występowania osteopenii koresponduje z wynikami z przedstawionego badania, natomiast częstość osteoporozy jest wyższa u pacjentów z Arabii Saudyjskiej [232]. De Silva i wsp. zaraportowali osteoporozę u 14,45% badanych chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i u 10,7% osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna, pochodzących ze Sri Lanki [233].

W przeprowadzonym badaniu nie odnotowano różnic w gęstości mineralnej kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i szyjce kości udowej między pacjentami z ChLC i WZJG. Podobnych obserwacji dokonali Silvennoinen i wsp. oraz Bjarnason i wsp [227, 234]. Powyższych obserwacji nie potwierdzają natomiast Ghosh i wsp. oraz Jahnsen i wsp., którzy wykazali zmniejszoną BMD u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna a nie u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [43, 235]. Częstsze występowanie niskiej masy kostnej u chorych z LC tłumaczy się zajęciem jelita cienkiego, stanami po resekcji przewodu pokarmowego, niedożywieniem, zaburzeniami wchłaniania wapnia i witaminy D [236].

W omawianym badaniu większą częstość osteoporozy i osteopenii odnotowano w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i szyjce kości udowej pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Podobnych obserwacji dokonali Etzel i wsp. Zali i wsp. oraz Ezzat i Hamdy [222, 237, 238]. Wzorec zwiększonej utraty kości trabelkularnej jest charakterystyczny dla wieku pomenopauzalnego oraz terapii glikokortykosteroidami. Badani pacjenci byli osobami młodymi, a w badaniu wzięły udział zarówno kobiety jak i mężczyźni, co dyskwalifikuje menopauzę jako przyczynę opisanych wyżej różnic w częstotliwości ubytku BMD. Wzmocnionej

uwagi i dalszych badań wymagałaby natomiast ocena zastosowania glikokortykosteroidów w terapii IBD i ich wpływ na masę kostną (nie było to celem aktualnie przedstawianego badania) [239].

Niezmiennie wysokie odsetki ubytku masy kostnej niezależnie od pochodzenia chorych zwracają uwagę lekarzy praktyków na istotny problem jakim jest wdrożenie odpowiedniej diagnostyki, leczenia i profilaktyki osteoporozy u chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit na całym świecie.

5.4.2 Gęstość mineralna kości a cechy morfologiczne

Parametry kliniczne takie jak wiek i masa ciała są uznanymi czynnikami ryzyka osteoporozy.

W niniejszej rozprawie zaobserwowano istotną korelację ujemną między wiekiem a gęstością szyjki kości udowej oraz T score dla szyjki kości udowej u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Wykazano także związek masy ciała i BMI z gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa oraz Tscore L2-L4 dla chorych na ChLC oraz dla zdrowych osób z grupy kontrolnej. Podobnie zaobserwowano także dodatnią korelację między BMD szyjki kości udowej T score SKU a masą ciała i BMI u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i w grupie kontrolnej.

Atreja i wsp. w badaniu przeprowadzonym na grupie 1703 pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii w Cleveland (USA) wykazali, że BMI było najsilniejszym niezależnym czynnikiem ryzyka dla osteoporozy. Podkreślono także rolę wieku – jednakże zależność ta nie była aż tak silna jak w przypadku niskiego BMI. Stanowisko to zgadza się także z wytycznymi Brytyjskiego Towarzystwa Gastroenterologii, w których niskie BMI jest postrzegane jako czynnik ryzyka niskiej gęstości mineralnej kości u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [240]. Podobnych obserwacji dokonano w badaniach Etzela i wsp. i Frei i wsp. [238, 239].

W badaniu przeprowadzonym przez Pigota i wsp. na grupie 61 chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wykazano istotną dodatnią korelację między gęstością mineralną szyjki kości udowej a masą ciała i BMI – podobnie jak w prezentowanej rozprawie. Nie

odnotowano natomiast związku między BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa a masą ciała i BMI [241].

Według spostrzeżeń dokonanych przez Silvennoinena i wsp. gęstość mineralna kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i szyjce kości udowej silnie korelowała z BMI zarówno u chorych z IBD jak i u osób zdrowych z grupy kontrolnej [234]. Obserwacje te były zgodne z poczynionymi w prezentowanym badaniu, podobnie jak spostrzeżenia Noble i wsp. – w opublikowanym przez zespół badaczy artykule wykazano silny związek niskiego BMI z osteoporozą u chorych na nieswoiste choroby zapalne jelit [178].

W badaniu Ezzata i Hamdy z 2010 roku podobnie jak w niniejszej rozprawie wykazano istotną korelację między gęstością mineralną kości u chorych z nieswoistymi chorobami jelit a indeksem masy ciała (BMI). Nie odnotowano natomiast zależności między BMD a wiekiem badanych chorych [222].

Spostrzeżeń dokonanych w powyższych badaniach i prezentowanej rozprawie nie potwierdza praca Bjarnasona i wsp. – nie wykazali oni korelacji między T score dla szyjki kości udowej a BMI [227].

Dane z licznych badań prowadzonych na przestrzeni lat wykazały, że masa ciała i BMI dodatkowo koreluje z gęstością mineralną kości, a jej spadek prowadzi do obniżenia masy kostnej [242, 243]. Zostało to udowodnione dla różnych grup wiekowych, kobiet i mężczyzn oraz różnych miejsc szkieletu. De Laet i wsp. w metaanalizie obejmującej 12 badań, w których udział wzięło prawie 60 tysięcy pacjentów udowodnili ochronny wpływ wysokich wartości BMI na gęstość kości [244]. Pacjenci z nieswoistymi chorobami jelit stanowią szczególną grupę pod względem czynników ryzyka osteoporozy. Niska masa ciała u tych chorych może wiązać się z niedożywieniem wynikającym z ograniczenia spożywania określonych produktów oraz z zaburzeń wchłaniania. Niedobory mogą dotyczyć także witamin oraz makro i mikroelementów zaangażowanych w metabolizm kostny, co z kolei może skutkować spadkiem gęstości mineralnej kości.

Zwraca się uwagę, że dodatnia zależność między masą ciała a BMD niekoniecznie musi oznaczać ochronny wpływ otyłości na kość i co za tym idzie na osteoporozę, gdyż otyłość postrzega się nie tylko jako podwyższony wskaźnik BMI ale także nagromadzenie tkanki tłuszczowej. Wpływ obudwu kompartmentów ciała- tłuszczowego i beztłuszczowego na tkankę kostną nie jest jednoznaczny. Według niektórych doniesień masa tkanki tłuszczowej

determinuje gęstość kości znacznie bardziej niż masa tkanek pozatłuszczowych [245, 246, 247, 248]. Teza ta wymaga jednak dalszych wnikliwych badań u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Większość prezentowanych badań potwierdza silny związek masy ciała i BMI z masą kostną. Różnice można tłumaczyć odmienną liczebnością badanych grup w prezentowanych doniesieniach, zróżnicowaniem etnicznym pacjentów, odmiennymi projektami badań lub rodzajem testów statystycznych. Możliwym wyjaśnieniem faktu dodatniej korelacji między BMD a masą ciała może być także adaptacja kości do zwiększonego obciążenia mechanicznego wywieranego przy udziale dużej masy.

Podnosi się także rolę czynników genetycznych. Deng i wsp. analizując populację chińską, wykazali, że uwarunkowanie genetyczne BMD i BMI jest wspólne w 10–20%. Wśród genów-kandydatów wymienia się gen IGF-1, leptynę, gen receptora dla leptyny, gen receptora estrogenowego, gen interleukiny 6 oraz rejon genu kodującego powstawanie RANK [249, 250].

Przedstawiona w niniejszej rozprawie zależność masy kostnej i masy ciała chorych jest zgodna z aktualnym stanem wiedzy wynikającym z licznych badań klinicznych. Analiza zależności gęstości mineralnej kości w grupie pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit wymaga jednak dalszych wnikliwych badań uwzględniających ocenę stanu odżywienia chorych, analizę składu ciała pacjentów, czynniki związane z aktywnością choroby i stosowane leki.

5.5 Polimorfizmy genu receptora witaminy D

5.5.1 Częstotliwość występowania i związek polimorfizmów genu VDR z występowaniem nieswoistych chorób zapalnych jelit

Polimorfizmy genetyczne są przedmiotem licznych badań dotyczących ich związku z występowaniem i zapadalnością na liczne choroby. Od blisko dwudziestu lat prowadzone są analizy częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów VDR oraz ich potencjalnego związku z zapadalnością na nieswoiste choroby zapalne jelit, mimo to wyniki nadal pozostają niejednoznaczne [251].

W prezentowanym badaniu genotyp BB w układzie recesywnym (gdzie allelem ryzyka był allel B) występował istotnie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej, również homozygoty tt występowały częściej wśród chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego niż w grupie kontrolnej.

Na problem pozwalają szerzej spojrzeć dwie przeprowadzone w ostatnim czasie metaanalizy. Metaanalizie przeprowadzonej przez Xue i wsp. poddano 9 badań prowadzonych w latach 1995-2011. Wykazano, że genotyp ff polimorfizmu FokI był związany z istotnym ryzykiem wystąpienia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u Azjatów, podczas gdy genotyp tt polimorfizmu TaqI wiązał się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby Leśniowskiego-Crohna dla chorych z populacji europejskiej oraz ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zarówno ChLC i WZJG dla Azjatów. Allel „a” dla polimorfizmu ApaI był czynnikiem ochronnym przed wystąpieniem choroby Leśniowskiego-Crohna [180]. Mechanizm tego zjawiska jest trudny do wyjaśnienia. Zlokalizowany w pobliżu polimorfizmu region genu, znajdujący się przy końcu 3' bierze udział w regulacji ekspresji genu, który wpływa na stabilność mRNA, co z kolei może prowadzić do obniżonego stężenia mRNA genu receptora witaminy D dając w rezultacie spadek poziomu witaminy D i zmniejszenie jej hamującego wpływu na IL-12. Skutkiem zmian w układzie immunologicznym jest wzmożona reakcja Th1-zależna, która może tłumaczyć wzrost podatności na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Wśród innych przyczyn takiego zjawiska wymienia się także nierównowagę sprzężeń genotypu tt. Metaanaliza opublikowana w 2014 roku przez Wanga i wsp. obejmowała 9 badań, w których udział wzięło 1796 chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 1666 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i 2647 osoby zdrowe. Sześć objętych metaanalizą badań dotyczyło polimorfizmu ApaI, pięć BsmI i FokI oraz osiem polimorfizmu TaqI. Wang i wsp. nie wykazali związku między polimorfizmami ApaI, BsmI i FokI a nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, natomiast wykazano, że polimorfizm TaqI zmniejszał ryzyko wystąpienia wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u przedstawicieli rasy kaukaskiej. W tej metaanalizie zwrócono szczególną uwagę na różnice w profilach genetycznych badanych mogące wynikać z rasy bądź grupy etnicznej badanych chorych [181].

W badaniu przeprowadzonym przez Hughes i wsp. na 660 chorych Irlandczykach z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i 699 osobach zdrowych podobnie jak w niniejszej rozprawie nie wykazano związku między chorobą a obecnością wariantów polimorfizmów genu receptora witaminy D [252].

W badaniu Dresner-Pollak i wsp. dotyczącym Żydów Aszkenazyjskich wykazano istotnie zwiększoną częstość występowania genotypu BB polimorfizmu BsmI u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w porównaniu do osób zdrowych [253]. Obserwacja ta jest zbliżona do wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie.

W badaniach przeprowadzonych na populacji europejskiej (Wielka Brytania, Niemcy) zaobserwowano związek genotypu tt polimorfizmu TaqI z występowaniem nieswoistych chorób zapalnych jelit, a w szczególności z chorobą Leśniowskiego-Crohna, zwrócono także uwagę na częstsze występowanie genotypu tt u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna przebiegającą z licznymi przetokami i zwężeniami [178, 251, 254].

W badaniu polskim przeprowadzonym przez Pluskiewicza i wsp. nie odnotowano różnic w rozkładzie polimorfizmów VDR między chorymi z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i zdrowymi osobami z grupy kontrolnej [179].

Rozbieżności w wynikach przedstawionych badań można tłumaczyć różną przynależnością rasową badanych chorych, wpływem czynników środowiskowych oraz występowaniem nierównowagi sprzężeń, która opisuje współwystępowanie alleli sąsiadujących ze sobą polimorfizmów. Podkreśla się konieczność prowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem dużej liczby chorych.

5.5.2 Związek polimorfizmów genu VDR ze stężeniem witaminy D

Witamina D w mechanizmie działania genomowego za pośrednictwem receptora VDR wpływa zarówno na homeostazę wapniową jak i ogólnoustrojowe procesy wzrostu, dojrzewania i różnicowania komórek.

U analizowanych chorych i osób zdrowych z grupy kontrolnej nie wykazano istotnego związku między stężeniem witaminy D a polimorfizmem VDR.

W badaniu przeprowadzonym na grupie 308 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna w Nowej Zelandii, a więc kraju o jednym z najwyższych współczynników zapadalności na tą chorobę na świecie, wykazano niższe stężenia witaminy D u osób chorych w porównaniu ze zdrowymi. Niskie stężenia 25(OH)D korelowały z wiekiem i niewielką ekspozycją na światło słoneczne. Wykazano także istotny związek niskiego stężenia witaminy D i polimorfizmu TaqI genu VDR u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz polimorfizmu ApaI genu VDR u osób z grupy kontrolnej [255].

W dostępnych bazach literaturowych brak jest innych badań zajmujących się analizą związku polimorfizmów witaminy D i stężenia witaminy D w tak specyficznej grupie chorych jaką są pacjenci z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

5.5.3 Polimorfizmy genu VDR a gęstość mineralna kości

Prowadzone na szeroką skalę badania molekularne mają na celu określenie czynników genetycznych, które predysponują do ubytku masy kostnej i tym samym wystąpienia osteopenii i osteoporozy. Badania nad związkiem polimorfizmów genu receptora witaminy D z gęstością mineralną kości często pozostają ze sobą w sprzeczności. Przypuszczalnie efekt taki może wynikać z ograniczonego udziału receptora VDR w metabolizmie kostnym.

W niniejszej rozprawie pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego będący heterozygotami Tt mieli niższą gęstość mineralną w obrębie szyjki kości udowej niż homozygoty tt, osoby z grupy kontrolnej będące homozygotami AA (ApaI) miały niższy Z score L2-L4 niż homozygoty aa. Zaobserwowano, że pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna będący homozygotą FF (FokI) mieli niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej, T score SKU niż homozygoty FF z grupy kontrolnej, heterozygoty Ff miały niższy T score L2-L4 i T score SKU niż heterozygoty z GK, natomiast pacjenci będący homozygotami ff mieli niższy T score L2-L4 i T score SKU niż homozygoty z grupy kontrolnej. Odnotowano, że pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna będący heterozygotami Bb (BsmI) mieli niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej wyrażoną jako BMD i T score SKU niż heterozygoty Bb z grupy kontrolnej, natomiast pacjenci będący homozygotami bb mieli niższą gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, niższe T score L2-L4, niższe T score SKU niż homozygoty bb z grupy kontrolnej. Wykazano, że pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna będący heterozygotą Aa (ApaI) mieli niższą gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, w obrębie szyjki kości udowej oraz niższe T score L2-L4 i T score SKU niż heterozygoty Aa z grupy kontrolnej, natomiast homozygoty aa spośród tej samej grupy chorych miały niższy T score L2-L4, T score SKU oraz Z score SKU niż homozygoty aa z grupy kontrolnej. Wśród pacjentów z chorobą LC będących homozygotami TT (TaqI) stwierdzono niższą gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa oraz T score L2-L4 i Z score SKU niż u homozygot TT z grupy kontrolnej, natomiast pacjenci będący heterozygotami Tt mieli niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej i T score SKU niż heterozygoty Tt z grupy kontrolnej. Zaobserwowano, że chorzy z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego będący homozygotami TT mieli niższą gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa niż homozygoty TT z grupy kontrolnej, natomiast heterozygoty Tt miały niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej i T score SKU niż heterozygoty Tt z grupy kontrolnej.

U 311 zdrowych kobiet z Sydney, z których 207 było w wieku pomenopauzalnym, Morrison i wsp. stwierdzili związek między genotypem BB polimorfizmu VDR a niższą gęstością mineralną kości [189]. Jednak Hustmyer i wsp. nie wykazali związku między kilkoma polimorfizmami VDR i gęstością mineralną kości kręgosłupa, kości udowej i przedramienia u 86 monozygotycznych i 39 dizygotycznych żeńskich par bliźniąt [256]. Podobne wnioski płyną z badań Chen i wsp. i Langdahl i wsp. Nie zaobserwowali oni istotnego związku między wariantami FokI i BsmI polimorfizmu genu VDR i gęstością mineralną kości zarówno wśród badanych chorych jak i w grupie kontrolnej [170, 257]. Brak związku badanych polimorfizmów z BMD może sugerować rolę innych czynników wpływających na BMD – szczególnie czynników środowiskowych. Badania Arrai i wsp., Harris i wsp. i Gross i wsp. wykazały natomiast związek polimorfizmów FokI i Bsm I genu VDR z niską gęstością mineralną kości odpowiednio w populacji: kobiet Japońskich, amerykańskich kobiet rasy czarnej i białej w wieku przedmenopauzalnym i amerykańskich kobiet pochodzenia meksykańskiego w wieku pomenopauzalnym [164, 258, 259]. Badanie Saintz i wsp. wykazało wpływ genu VDR na gęstość mineralną kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa, jednakże tutaj grupę badaną stanowiły dziewczynki w wieku przedpokwitaniowym pochodzenia meksykańskiego [174]. Być może odmienności przedstawionych w niniejszej pracy spostrzeżeń wynikają z heterogenności grupy badanej pod względem płci – podczas gdy w przytoczonych badaniach brały udział wyłącznie kobiety i dziewczynki.

W badaniu Todhunter i wsp. przeprowadzonym na 245 chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna nie wykazano istotnego związku między polimorfizmem genu receptora witaminy D a gęstością mineralną kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa i szyjki kości udowej [69].

W badaniu polskim przeprowadzonym przez Pluskiewicza i wsp. na 47 pacjentach z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego wykazano, że genotyp bb rzadziej wiązał się z niską BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa u mężczyzn, natomiast genotyp tt wiązał się z niską gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u kobiet. W prezentowanym badaniu nie odnotowano podobnych zależności u pacjentów z WZJG, natomiast u chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna homozygoty bb miały gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, niższe T score L2-L4, niższe T score SKU niż homozygoty bb z grupy kontrolnej. Być może podane odmienności wiążą się z odmienną jednostką chorobową lub są spowodowane heterogennością grupy badanej pod względem płci. W obrębie polimorfizmu TaqI, w grupie pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego zaobserwowaliśmy, że

pacjenci będący homozygotami tt mieli istotnie statystycznie wyższą gęstość mineralną szyjki kości udowej niż heterozygoty Tt. Nasze spostrzeżenie różni się od obserwacji poczynionych przez Morrisona, gdzie wykazano, że pacjenci homozygoty BB i tt charakteryzują się niższą masą kostną, różni się także od przytoczonych wcześniej obserwacji Pluskiewicza i wsp. [179, 189]. Być może wariant tt pełni u homozygot z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego funkcję ochronną w zakresie BMD lub jest to spowodowane czynnikami środowiskowymi. W badaniu Noble i wsp., w którym udział wzięło 440 pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit, nie wykazano związku między polimorfizmami TaqI i ApaI a masą kostną, natomiast wykazano, że jedynym niezależnym czynnikiem związanym z osteoporozą była niska masa ciała i niskie BMI [178].

W obrębie polimorfizmu ApaI, w grupie kontrolnej pacjenci będący homozygotami aa mieli istotnie statystycznie wyższy Z score L2-L4 niż homozygoty AA. Nie zaobserwowano natomiast takiej zależności dla BMD L2-L4. Za prawdopodobną przyczynę takiej obserwacji uznać można młody wiek chorych w grupie kontrolnej (średnio 30,74±8,6 lat).

Zaobserwowane istotne różnice w BMD, T score i Z score dla odcinka L2-L4 lub bliższego końca szyjki kości udowej wśród pacjentów z różnymi jednostkami chorobowymi bądź należącymi do grupy kontrolnej natomiast będącymi homogenicznymi pod względem genetycznym nasuwają spostrzeżenie, że być może to przynależność do grupy (a więc jednostka chorobowa i jej konsekwencje lub jej brak) mają wpływ na gęstość mineralną kości a nie wariant polimorfizmu genu VDR. Warto dodać, że postuluje się możliwość modyfikowania korelacji między genotypem VDR a gęstością mineralną kości ilością przyjmowanego wapnia i witaminy D [260].

Wyniki uzyskane z licznych badań prowadzonych na różnych populacjach są często rozbieżne. Przyczyn takiego zjawiska można upatrywać w małych liczebnościach badanych chorych oraz wielogenowym podłożu zarówno chorób zapalnych jelit jak i osteoporozy, co znacznie utrudnia wnioskowanie ograniczone do allelu jednego genu.

5.6 Podsumowanie

Otrzymane w prezentowanej pracy wyniki badań oraz przegląd piśmiennictwa stanowią podłoże do dalszych badań. Naszą grupę badaną stanowili pacjenci z chorobami zapalnymi jelit – chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, więc także jednostkami chorobowymi u podłoża których leżą czynniki genetyczne i środowiskowe, co

stanowiło dodatkową trudność badawczą. Warto nadmienić, że porównanie wykonane w tej pracy jest więc spojrzeniem dość rzadkim. Witamina D ze względu na swoje wielokierunkowe działanie cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem naukowców, szczególnie w kontekście nieswoistych chorób zapalnych jelit. Podkreśla się konieczność prowadzenia badań randomizowanych na tej grupie chorych. Wszystkie polimorfizmy badane w niniejszej pracy należą do polimorfizmów niezwykle często analizowanych w aspekcie rzeczywistego wpływu na rozwój osteoporozy w populacjach na całym świecie. Często uzyskiwane są niejednoznaczne a nawet sprzeczne wyniki. Jednakże sprzeczność wyników dotychczasowych wskazuje na potrzebę dalszych analiz w kolejnych populacjach.

Mocnymi stronami prezentowanego badania jest wnikliwe spojrzenie na dwie choroby o wieloczynnikowej etiologii. Prezentowane badanie posiada także kilka ograniczeń, wśród których warto wspomnieć o braku danych dotyczących przebiegu choroby, leczenia, parametrów stanu zapalnego, gospodarki wapniowo-fosforanowej i obrotu kostnego, co znacznie wzbogaciłoby wartość uzyskanych wyników i przyczyniło się do poszerzenia wiedzy klinicznej.

Odpowiednio zaprojektowana diagnostyka molekularna, opierająca się na analizie zasocjowanych z chorobą wariantów allelicznych genów kandydujących, umożliwiłaby oszacowanie predyspozycji i samego ryzyka rozwoju choroby na długo przed pojawieniem się pierwszych objawów. To pozwoliłoby na bardzo wczesne wdrożenie zabiegów zapobiegających rozwojowi samej choroby, bądź terapii opóźniających jej rozwój czy takich działań, które łagodziłyby jej przebieg u osób z chorobą będącą już w pewnym stopniu zaawansowania. Przeprowadzone badanie wskazuje także na potrzebę wykonywania badań densytometrycznych oraz kontrolę stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit a tym samym podjęcie działań profilaktycznych i terapeutycznych. W wielu przypadkach już sama zmiana stylu życia, nawyków żywieniowych i być może odpowiedniej suplementacji mogłaby zahamować rozwój schorzenia, gdyż czynniki środowiskowe także wydają się pełnić istotną rolę w przebiegu analizowanych chorób.

6. Wnioski

A) Zarówno w grupie chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jak i u osób zdrowych z grupy kontrolnej zaobserwowano wysoki odsetek osób z niedoborem witaminy D. Nie wykazano różnic w stężeniu witaminy D między chorymi z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit a grupą kontrolną. Świadczy to o niedoborze witaminy D w populacji ogólnej i wskazuje na konieczność suplementacji zarówno u chorych z nieswoistymi chorobami jelit jak i u osób zdrowych.

B) U chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zaobserwowano wysoki odsetek występowania osteopenii. Odsetek występowania osteoporozy dotyczył w większym stopniu pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

C) Wykazano, że gęstość mineralna kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zależy od masy ciała chorych. W związku z tym należy monitorować stan odżywienia chorych i uzupełniać niedobory żywieniowe.

D) Zaobserwowano, że masa ciała nie wpływała na stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D. Obserwacja ta wymaga jednak potwierdzenia na większych grupach badanych.

E) Nie wykazano związku między stężeniem witaminy D a gęstością mineralną kości zarówno w grupie chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit jak i w grupie kontrolnej. Spostrzeżenie to wymaga dalszych badań, ze szczególnym uwzględnieniem badań eksperymentalnych z randomizacją przeprowadzanych na dużych grupach badanych wywodzących się z różnych populacji.

F) Wykazano, że genotyp BB w układzie recesywnym [BB vs Bb+bb] występował istotnie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej. Genotyp tt występował częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej. Nie obserwowano różnicy w częstości występowania pozostałych badanych polimorfizmów wśród chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.

G) Zarówno w grupie pacjentów z nieswoistymi chorobami jelit jak i w grupie kontrolnej nie zaobserwowano związku polimorfizmu genu VDR ze stężeniem witaminy D.

H) Zaobserwowano, że pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego będący heterozygotami Tt mieli niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej niż homozygoty tt.

I) W homogenicznych pod względem genetycznym grupach pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej zaobserwowano różnice w gęstości mineralnej kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa i bliższego końca szyjki kości udowej.

J) Przeprowadzone badanie wskazuje na potrzebę wykonywania badań densytometrycznych oraz kontrolę stężenia witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w celu podjęcia działań profilaktycznych i terapeutycznych. Wskazano także na przydatność diagnostyki molekularnej w identyfikacji pacjentów z grup ryzyka na długo przed wystąpieniem objawów choroby.

7. Streszczenie

Wstęp: Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to grupa przewlekłych stanów zapalnych przewodu pokarmowego, wśród których wymienia się chorobę Leśniowskiego-Crohna (LC) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG). NChZJ nie dotyczą tylko jednego organu i powinny być traktowane jako choroby układowe z uwzględnieniem szeregu manifestacji pozajelitowych, wśród których istotny problem medyczny stanowią osteopenia i osteoporoza. Osteoporoza jest definiowana jako systemowa metaboliczna choroba szkieletu, która charakteryzuje się postępującym ubytkiem masy kostnej, osłabieniem struktury przestrzennej kości i podatnością na złamania. Witamina D spełnia w organizmie rolę prohormonu, a jej głównymi źródłami są synteza skórna pod wpływem promieni słonecznych oraz podaż z pokarmem. Niedobór witaminy D wydaje się być problemem ogólnoswiatowym, a pacjenci z NChZJ są grupą o szczególnym narażeniu na jego wystąpienie. Dla obydwu chorób - nieswoistych chorób zapalnych jelit i osteoporozy silnym elementem łączącym jest duży udział zarówno czynników genetycznych jak i środowiskowych w ich etiologii. Duże nadzieje pokłada się w poznaniu funkcji genów kandydujących. Gen receptora witaminy D – VDR zlokalizowany jest w regionie 13 na długim ramieniu (q) chromosomu 12 (12q13.11). Do najczęściej analizowanych polimorfizmów tego genu należą FokI, BsmI, ApaI, TaqI. W badaniach przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat zwraca się uwagę na związek polimorfizmów VDR z gęstością mineralną kości, wzrostem podatności na choroby autoimmunologiczne.

Cel pracy:

Celem pracy była analiza związków między polimorfizmami genu VDR, stężeniem witaminy D w surowicy i gęstością mineralną kości u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Cel realizowano przez następujące cele szczegółowe:

- A) Ocena stopnia niedoboru witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i porównanie z grupą kontrolną.
- B) Ocena gęstości mineralnej kości u badanych chorych.
- C) Ocena masy ciała i jej związku z gęstością mineralną kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.
- D) Ocena związku masy ciała ze stężeniem witaminy D u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.

E) Poszukiwanie związku stężenia witaminy D z gęstością mineralną kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej.

F) Ocena częstości występowania polimorfizmów genu receptora witaminy D u badanych chorych i w grupie kontrolnej.

G) Poszukiwanie związku polimorfizmów genu VDR ze stężeniem witaminy D u badanych chorych i w grupie kontrolnej.

H) Ocena związku polimorfizmów genu VDR z gęstością mineralną kości u badanych chorych i w grupie kontrolnej.

I) Ocena gęstości mineralnej kości w homogenicznej pod względem polimorfizmów genu VDR grupie chorych i w grupie kontrolnej.

J) Ocena przydatności przeprowadzonego badania w praktyce klinicznej.

Hipoteza badawcza: U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit występuje niedobór witaminy D oraz obniżona gęstość mineralna kości. Istnieje związek między gęstością mineralną kości, stężeniem witaminy D a polimorfizmami genu receptora witaminy D (VDR).

Materiał i metody: Grupę badano stanowiło 172 pacjentów, w tym 85 z chorobą Leśniowskiego-Crohna i 87 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, dodatkowo przebadano 39 zdrowych osób. Badania densytometryczne odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L1-L4) oraz szyjki kości udowej (SKU) pacjentów zostały wykonane metodą DEXA (dwuenergetyczna absorpcjometria rentgenowska – ang. *dual energy X-ray absorptiometry*) przy użyciu aparatu DPX-Plus firmy Lunar. U wszystkich pacjentów wykonano oznaczenie stężenia 25 OH D w surowicy metodą wiązania elektrochemiluminiscencyjnego przy użyciu testu i analizatora Cobas e 601. DNA izolowano z osocza krwi obwodowej metodą z zastosowaniem izotiocyjanianu guanidyny (GTC). Fragmenty DNA obejmujące miejsca polimorficzne genu VDR amplifikowano za pomocą PCR. Następnie produkty hydrolizowano stosując odpowiednie enzymy restrykcyjne w celu wykrycia polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) w genie VDR. Po inkubacji produkty RFLP rozdzielono w żelu agarozowym (1,5%) z bromkiem etydyny. Analizę statystyczną prowadzono przy użyciu programu STATISTICA 12.0 (StatSoft).

Wyniki: W badanych grupach wykazano wysoki odsetek deficytu witaminy D: w grupie chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna – 49,41%, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

– 44,83% jak i u osób zdrowych z grupy kontrolnej – 48,72%. Nie odnotowano istotnie statystycznego związku między przynależnością do grupy badanej a kategoriami zaopatrzenia organizmu w witaminę D. Nie wykazano różnic w stężeniu witaminy D w badanych grupach ($p>0,05$). U chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zaobserwowano wysoki odsetek występowania osteopenii (L2-L4: LC – 38,82%, WZJG – 34,48%; SKU: LC -36,47%, WZJG – 27,59%). Odsetek występowania osteoporozy dotyczył w większym stopniu pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (L2-L4: 9,41% vs 2,30%; SKU: 5,88% vs 1,15%). Gęstość mineralna kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zależy od masy ciała chorych (np. LC: L2-L4 BMD $r=0,47$; $p<0,001$, SKU BMD $r=0,59$; $p<0,001$, WZJG: SKU BMD $r=0,33$; $p<0,01$). Nie odnotowano istotnych statystycznie związków między masą ciała a stężeniem witaminy D ($p>0,05$). Ponadto nie odnotowano istotnych statystycznie korelacji między gęstością mineralną kości a stężeniem witaminy D ($p>0,05$). Wykazano, że genotyp BB w układzie recesywnym [BB vs Bb+bb] występował istotnie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej (OR=4.06, CI=[1.14-14.51], $p=0.022$). Genotyp tt występował częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej (OR = 3,58, CI = [1,00-12.87], $p = 0,040$). W badanych grupach osoby o różnych wariantach polimorfizmów nie różniły się istotnie statystycznie pod względem stężenia witaminy D ($p>0,05$). Pacjenci z WZJG będący heterozygotami Tt charakteryzowali się istotnie statystycznie niższą gęstością mineralną szyjki kości udowej niż homozygoty tt ($p<0,05$). Wśród osób z takimi samymi wariantami polimorfizmów ale należącymi do różnych grup badanych odnotowano istotne statystycznie różnice pod względem gęstości mineralnej kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa i bliższego końca szyjki kości udowej.

Wnioski:

A) Zarówno w grupie chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego jak i u osób zdrowych z grupy kontrolnej zaobserwowano wysoki odsetek osób z niedoborem witaminy D. Nie wykazano różnic w stężeniu witaminy D między chorymi z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit a grupą kontrolną. Świadczy to o niedoborze witaminy D w populacji ogólnej i wskazuje na konieczność suplementacji zarówno u chorych z nieswoistymi chorobami jelit jak i u osób zdrowych.

B) U chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zaobserwowano wysoki odsetek występowania osteopenii. Odsetek występowania osteoporozy dotyczył w większym stopniu pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna.

- C) Wykazano, że gęstość mineralna kości u chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit zależy od masy ciała chorych. W związku z tym należy monitorować stan odżywienia chorych i uzupełniać niedobory żywieniowe.
- D) Zaobserwowano, że masa ciała nie wpływała na stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D. Obserwacja ta wymaga jednak potwierdzenia na większych grupach badanych.
- E) Nie wykazano związku między stężeniem witaminy D a gęstością mineralną kości zarówno w grupie chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit jak i w grupie kontrolnej. Spostrzeżenie to wymaga dalszych badań, ze szczególnym uwzględnieniem badań eksperymentalnych z randomizacją przeprowadzanych na dużych grupach badanych wywodzących się z różnych populacji.
- F) Wykazano, że genotyp BB w układzie recesywnym [BB vs Bb+bb] występował istotnie częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej. Genotyp tt występował częściej u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego niż w grupie kontrolnej. Nie obserwowano różnicy w częstości występowania pozostałych badanych polimorfizmów wśród chorych z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej.
- G) Zarówno w grupie pacjentów z nieswoistymi chorobami jelit jak i w grupie kontrolnej nie zaobserwowano związku polimorfizmu genu VDR ze stężeniem witaminy D.
- H) Zaobserwowano, że pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego będący heterozygotami Tt mieli niższą gęstość mineralną szyjki kości udowej niż homozygoty tt.
- I) W homogenicznych pod względem genetycznym grupach pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit i w grupie kontrolnej zaobserwowano różnice w gęstości mineralnej kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa i bliższego końca szyjki kości udowej.
- J) Przeprowadzone badanie wskazuje na potrzebę wykonywania badań densytometrycznych oraz kontrolę stężenia witaminy D u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit w celu podjęcia działań profilaktycznych i terapeutycznych. Wskazano także na przydatność diagnostyki molekularnej w identyfikacji pacjentów z grup ryzyka na długo przed wystąpieniem objawów choroby.

8. Summary

Introduction Inflammatory bowel diseases (IBD) comprise a group of chronic inflammatory conditions of the alimentary tract, among which there is Crohn's disease (LC) and ulcerative colitis (UC). IBD's do not refer to just one organ and should be treated as a systemic disease, taking into account a number of parenteral manifestations, among which osteopenia and osteoporosis constitute a serious medical issue. Osteoporosis is defined as the systemic metabolic bone disease which is characterised by the gradual bone mass loss, the weakening of the spatial structure of bones and the susceptibility to bone fractures. Vitamin D plays the role of a prohormone in the organism, and its main sources include skin synthesis under the influence of sunlight and food supply. Shortage of vitamin D seems to be a global problem and patients with IBD constitute a group which is particularly exposed to it. For both diseases - inflammatory bowel disease and osteoporosis, a strong connecting element between them is the great share of both genetic and environmental factors in their aetiology. Much hope is being placed in exploring the functions of candidate genes. Vitamin D receptor gene - *VDR* - is located in region 13, on the long arm (q) of chromosome 12 (12q13.11). The most frequently analysed polymorphisms of this gene include FokI, BsmI, ApaI, TaqI. In the studies conducted in the recent years, attention is paid to the relationship between the *VDR* polymorphisms and the bone mineral density and the increased susceptibility to auto-immune diseases.

Aim:

The aim of the study was to analyze the relationship between polymorphisms of the *VDR* gene, serum vitamin D concentration and bone mineral density in patients with inflammatory bowel diseases. The objective was realized through the following specific objectives:

- A) The evaluation of the degree of vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease and the comparison with the control group.
- B) The evaluation of the bone mineral density in patients.
- C) The evaluation of the body mass and its correspondence to the bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease and in the control group.
- D) The evaluation of the relationship between the body mass and the concentration of vitamin D in patients with inflammatory bowel disease and in the control group.
- E) The search for a relationship between the concentration of vitamin D with the bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease as compared with the control group.

F) The evaluation of the prevalence of polymorphisms of the vitamin D receptor gene in patients and in the control group.

G) The search for a relationship between the polymorphisms of the VDR gene with the concentration of vitamin D in patients and in the control group.

H) The evaluation of the relationship between the polymorphisms of the VDR gene with the bone mineral density in patients and in the control group.

I) The evaluation of the bone mineral density in the group of patients, which is homogeneous with regards to the VDR gene polymorphisms, and in the control group.

J) The evaluation of the usefulness of the conducted study in clinical practice.

Research hypothesis: In patients with inflammatory bowel disease, there is vitamin D deficiency and reduced bone mineral density. There is a relationship between the bone mineral density, the vitamin D concentration and the polymorphisms of the vitamin D receptor gene (VDR).

Material and methods: The studied group consisted of 172 patients, including 85 with Crohn's disease and 87 with ulcerative colitis; additionally 39 healthy subjects were examined. Densitometry of the lumbar spine (L1-L4) and the neck of femur in patients was performed by means of DEXA (*dual energy X-ray absorptiometry*), using DPX-Plus manufactured by Lunar. In all the patients, the determination of the 25 OHD concentration in serum by means of the electrochemiluminescent bonding was performed using the Cobas e 601 test and analyser. DNA was isolated from peripheral blood plasma by means of a method which involved the use of guanidine isothiocyanate (GTC). DNA fragments which included polymorphic sites of the VDR gene were amplified by means of PCR. Then, the products were hydrolysed using suitable restriction enzymes in order to detect the restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the VDR gene. After incubation, the RFLP products were separated in agarose gel (1.5%) with ethidium bromide. Statistical analysis was conducted using the STATISTICA 12.0 software (StatSoft).

Results: The analysed groups demonstrated a high percentage of vitamin D deficit: the group of patients with Crohn's disease – 49.41%, the patients with ulcerative colitis – 44.83% and healthy subjects from the control group – 48.72%. A statistically significant relationship between the affinity to the studied group and the categories of vitamin D supply for the organism was not observed. No differences in the vitamin D concentration were demonstrated

in the studied groups ($p>0.05$). A high prevalence of osteopenia was observed in patients with inflammatory bowel disease (L2-L4: CD – 38.82%, UC – 34.48%; FN: CD -36.47%, UC – 27.59%). The prevalence of osteoporosis referred, to a greater extent, to patients with Crohn's disease (L2-L4: 9.41% vs 2.30%; FN: 5.88% vs 1.15%). Bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease depends on the patient body mass (e.g. CD: L2-L4 BMD $r=0.47$; $p<0.001$, FN BMD $r=0.59$; $p<0.001$, UC: FN BMD $r=0.33$; $p<0.01$). No statistically significant relationships were found between the body mass and the vitamin D concentration ($p>0.05$). Furthermore, no statistically significant correlations were found between the bone mineral density and the vitamin D concentration ($p>0.05$). It was demonstrated that the BB genotype in the recessive model [BB vs Bb+bb] occurred significantly more often in patients with ulcerative colitis than in the control group (OR=4.06, CI=[1.14-14.51], $p=0.022$). The tt genotype occurred more frequently in patients with ulcerative colitis than in the control group (OR = 3.58, CI = [1.00-12.87], $p = 0.040$). Within the studied groups, persons with different variants of polymorphisms did not differ statistically in terms of the vitamin D concentration ($p>0.05$). Patients with UC, being Tt heterozygotes were characterised by the statistically lower mineral density of the neck of femur than tt homozygotes ($p<0,05$). Among persons with the same variants of polymorphisms, but belonging to different studied groups, statistically significant differences were observed with regards to the bone mineral density in the lumbar spine and the closer end of the neck of femur.

Conclusions:

A) Both in the group of patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and in healthy subjects from the control group, a high percentage of persons with vitamin D deficiency was observed. No differences in the concentration of vitamin D were demonstrated between the patients with inflammatory bowel disease and the control group. This proves the shortage of vitamin D in the general population and indicates the necessity of supplementation both in patients with bowel disease and in health subjects.

B) A high prevalence of osteopenia was observed in patients with inflammatory bowel disease. The prevalence of osteoporosis referred, to a greater extent, to patients with Crohn's disease.

C) It was demonstrated that bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease depends on the patients' body mass. Therefore, it is necessary to monitor the nutritional state of the patients and supplement the nutritional deficiencies.

D) An observation was made that the body mass does not affect the vitamin D supply for the organism. However, this observation requires confirmation on larger studied groups.

E) No relationship was demonstrated between the vitamin D concentration and the mineral density of bones both in the group of patients with inflammatory bowel disease and in the control group. This observation requires further research, with particular consideration of experimental research including randomisation, conducted on large studied groups coming from different populations.

F) It was demonstrated that the BB genotype in the recessive model [BB vs Bb+bb] occurred significantly more often in patients with ulcerative colitis than in the control group. The tt genotype occurred more often in patients with ulcerative colitis than in the control group. No difference was observed in the prevalence of other studied polymorphisms among the patients with inflammatory bowel disease and in the control group.

G) The relationship between the VDR gene polymorphism and the vitamin D concentration was neither observed in the group of patients with inflammatory bowel disease nor in the control group.

H) An observation was made that the patients with ulcerative colitis, being Tt heterozygotes, had lower mineral density of the neck of femur than those being tt homozygotes.

I) In genetically homogeneous groups of patients with inflammatory bowel disease and in the control group, differences in the bone mineral density in the lumbar spine and the closer end of the neck of femur were observed.

J) The conducted study indicates the need for densitometry and for control of the vitamin D concentration in patients with inflammatory bowel disease in order to take prophylactic and therapeutic actions. Also, the usefulness of molecular diagnostics in the identification of patients from risk groups long before the occurrence of symptoms of the disease was indicated.

9. Bibliografia

1. Ordas I, Eckan L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;3;380:1606-1619.
2. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(1):3-25.
3. Yamada T. Red. naukowa wydania polskiego: Ewa Małecka-Panas. Podręcznik gastroenterologii, Wyd. Czelej, wydanie I, 2006.
4. Baumgart D, Sandborn W. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;3,380:1590-1605.
5. Eder P, Łodyga M, Łykowska-Szuber L, Bartnik W, Durlík M, Gonciarz M, Kłopotcka M, Linke K, Małecka-Panas E, Radwan P, Rydzewska G. Wytyczne Grupy Roboczej Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii i Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące postępowania z pacjentem z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. *Prz Gastroenterol* 2013;8,1:1-20.
6. Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Prz Gastroenterol*. 2007,2,5: 215-229.
7. Pera A, Bellando P, Caldera D, Ponti V, Astegiano M, Barletti C, David E, Arrigoni A, Rocca G, Verme G. Colonoscopy in Inflammatory Bowel Disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. *Gastroenterology*. 1987;92(1):181-185.
8. Horsthuis K, Bipat S, Bennink RJ, Stoker J. Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: metaanalysis of prospective studies. *Radiology*. 2008;247:64-79.
9. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Aug;50(8):942-51. doi: 10.3109/00365521.2015.1014407. Epub 2015 Feb 17.
10. Loftus Jr EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517.
11. Okabe N. The pathogenesis of Crohn's disease. *Digestion*, 2001;63(1):51-59.
12. Shikhare G, Kugathasan S. Inflammatory bowel disease in children: current trends. *J Gastroenterol*. 2010;45:673-682.
13. Rejestr Choroby Crohna, www.chorobacrohna.pl
14. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology and Hepatology*. 2013;9:6:367-374.
15. Kamińska B, Landowski P. Rola wybranych czynników środowiskowych w etiopatogenezie nieswoistych zapaleń jelit. *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2009;3;1:42-48.
16. Kirsner JB, Spencer JA. Family occurrences of ulcerative colitis, regional enteritis, and ileocolitis. *Ann Intern Med*. 1963;59:133-144.
17. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 2003;124:1767-1773.

18. Leedham SJ, Jankowski JA, Wright NA, Tomlinson IP. Genetics of inflammatory bowel disease and associated cancers. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2006;2:191-199.
19. Lees CW, Barrett LC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*, 2011;60:1739-1753.
20. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:105-118.
21. Jakubowska-Burek L, Kaczmarek E, Hoppe-Golebiewska J, Kaczmarek-Ryś M, Hryhorowicz S, Kucharski M, Slomski R, Linke K, Dobrowolska-Zachwieja A. Genotyping of CARD15/NOD2, ATG16L1 and IL23R Genes in Polish Crohn's Disease (CD) Patients – Are They Related to the Localization of the Disease and Extra-Intestinal Symptoms? Ed. by: Sami Karoui. [Rijeka]: InTech, 2012;39-58.
22. Silverberg MS. OCTNs: will the real IBD5 gene please stand up? *World J. Gastroenterol.*, 2006;12:3678-3681.
23. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 2004;36:476-480.
24. Zatorski H, Sałaga M, Zielińska M, Fichna J. Czynniki genetyczne w patogenezie, przebiegu i leczeniu nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015;69:335-344.
25. Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:1399-1406.
26. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol.* 2007;13:6134-6139.
27. Russell R, Wilson D, Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child.* 2004 Jul;89(7):598–603.
28. Chapman-Kiddel C.A., Davies P.S, Gillen L., Radford-Smith G.L. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:137-151.
29. Dobrowolska-Zachwieja A. Optymalizacja leczenia tiopurynami u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. *Gastroenterologia Kliniczna* 2011;3(2):88–93.
30. Dobrowolska-Zachwieja A, Jakubowska-Burek L. Korzyści leczenia biologicznego u osób z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. *Przegląd Gastroenterologiczny.* 2010; 5(2):68–76.
31. Eder P, Łodyga M, Łykowska-Szuber L, Bartnik W., Gonciarz M., Kłopocka M., Linke K., Małecka-Panas E., Radwan P., Reguła J., Rydzewska G. Wytyczne Grupy Roboczej Konsultanta Krajowego w dziedzinie Gastroenterologii i Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące postępowania z pacjentem z chorobą Leśniowskiego-Crohna. *Prz Gastroenterol* 2012;7(6):317-338.
32. Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med.* 2010;42:97-114.

33. Gionchetti P, Dignass A, Danese S, Magro Dias FH, Rogler G, Lakatos PL, Adamina M, Ardizzone S, Buskens CJ, Sebastian S, Laureti S, Sampietro GM, Vucelic B, Van der Woude CJ, Barreiro-de Acosta M, Maaser C, Portela F, Vavricka SR, Gomollón F, on behalf of ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 2: Surgical Management and Special Situations. *J Crohns Colitis*. 2017 Feb;11(2):135-149.
34. Głuszko P. Osteoporoza – spojrzenie w przeszłość. *Reumatol* 2011;49(5):372-377.
35. Lorenc R, Głuszko P, Karczmarewicz E, Misiorowski W, Księżopolska-Orłowska K, Franek E, Horst-Sikorska W, Jabłoński M, Jaworski M, Katra B, Męczekalski B, Pluskiewicz W, Przedlacki J, Skalska A, Więcek A. Zalecenia postępowania diagnostycznego i leczniczego w osteoporozie – aktualizacja 2013. *Medycyna Praktyczna*, wyd. specj. *Reumatologia* 1/2013.
36. Lorenc R, Głuszko P, Franek E, Jabłoński M, Jaworski M, Kalinka-Warzocha E, Karczmarewicz E, Kostka T, Księżopolska-Orłowska K, Marcinowska-Suchowierska E, Misiorowski W, Więcek A. Zalecenia postępowania diagnostycznego i leczniczego w osteoporozie w Polsce. Aktualizacja 2017. *Endokrynol Pol* 2017; 68 (5): 604–609.
37. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int*. 1992;2(6):285-289.
38. Melton III LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL: Perspective: How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;7:1005-1010.
39. Randell A, Sambrook PN, Nguyen TV, Lapsey H, Jones G, Kelly PJ, Eisman JA. Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporosis Int* 1995;5:427-432.
40. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone* 2006;38:4-9.
41. Czerwiński E, Rozpondek P, Synder M et al. Problem złamań osteoporotycznych. [W:] Czerwiński E (red nauk.) *Osteoporoza - problem interdyscyplinarny*. PZWL, Warszawa 2015: 148-159.
42. Ali T, Lam D, Bronze MS, Humprey MB. Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *American Journal of Medicine*. 2009;122,7:599-604.
43. Jahnsen J, Falsch JA, Aadland E, Mowickel P. Bone mineral density is reduced in patients with crohn's disease but not in patients with ulcerative colitis: a population based study. *Gut*. 1997;40; 313-319.
44. Janiszewska M, Kulik T, Dziedzic M, Żołnierczuk-Kieliszek D, Barańska A. Osteoporoza jako problem społeczny – patogeneza, objawy i czynniki ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej. *Probl Hig Epidemiol* 2015,96(1):106-114.
45. Chwojnowska Z, Charzewska J. Osteoporoza – aktualne wyzwanie. *Żyw Człow* 2008,35(2):151-184.
46. Nelson DA, Beck TJ, Wu G et al.: Ethnic differences in femur geometry in the women's health initiative observational study. *Osteoporos Int*. 2011;22:1377-1388.
47. Marcinowska Suchowierska E. Czynniki ryzyka rozwoju osteoporozy oraz wystąpienia złamania. *Osteoporoza*. PZWL, Warszawa 2004:21-31.
48. NOGG 2017: Clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis National Osteoporosis Guideline Group, <https://www.sheffield.ac.uk/NOGG/>

49. Faye K, Kiela P. Advances in the understanding of mineral and bone metabolism in inflammatory bowel diseases. *AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300;2:191-201.
50. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*. 2003;124(3):795-841.
51. Krawitt EL, Beeken WL, Janney CD. Calcium absorption in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1976;71(2):251-254.
52. Leslie WD, Miller N, Rogala L, Bernstein CN. Body mass and composition affect bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(1):39-46.
53. Rodriguez-Bores L, Barahona-Garrido J, Yamamoto-Furusho JK. Basic and clinical aspects of osteoporosis in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(46):6156-6165.
54. Foltyn W, Kos-Kudła B, Marek B, Kajdaniuk D, Głogowska-Szeląg J, Siemińska L, Strzelczyk J, Borowska M. Osteoporoza poststeroidowa 2007;58(2):170-175.
55. Cashman KD, Shanahan F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(6):607–613.
56. Schoon EJ, Muller MC, Vermeer C, Schurgers LJ, Brummer RJ, Stockbrugger RW. Low serum and bone vitamin K status in patients with longstanding Crohn's disease: another pathogenetic factor of osteoporosis in Crohn's disease? *Gut* 2001;48:437-477.
57. Robinson RJ, Iqbal SJ, Al-Azzawi F, Abrams K, Mayberry JF. Sex hormone status and bone metabolism in men with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:21–25.
58. Vacek, TP, Kalani A, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clin Chem Lab Med*, 2013.51(3):579-90.
59. Owczarek D, Cibor D, Sałapa K, Jurczyszyn A, Mach T. Homocysteine in patients with inflammatory bowel diseases. *Przegląd Lekarski*. 2014;71(4):189-192.
60. Peacock M, Turner CH, Econs MJ et al. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:303-326.) (Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:629-662.
61. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:629-662.
62. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Diez-Perez A, Dunning AM, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, Van Leeuwen JPTM, Van Meurs JBJ, Mangion J, McGuigan FEA, Mellibovsky L, Del Monte F, Pols HAP, Reeve J, Reid DM, Renner W, Rivadeneira F, Van Schoor NM, Sherlock RE, Ioannidis JPA and for the GENOMOS investigators. Large-scale evidence for the effect of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: The GENOMOS study. *PloS Med* 2006;3(4):515-523.
63. Mezquita-Raya P, Munoz-Torres M, De Dios Luna J, Lopez-Rodriguez F, Quesada JM, Louque-Recio F, Escobar-Jimenez F. Performance of COLIA1 polymorphism and bone turnover markers to identify postmenopausal women with prevalent vertebral fractures. *Osteoporosis Int* 2002;13(6):506-512.

64. Witas H, Wujcicka WI. Genetyczne wyznaczniki osteoporozy. *Postępy Biologii Komórki* 2007;34(3):495-509.
65. Albagha OM, Pettersson U, Stewart A, Mc Guigan FE, Mac Donald HM, Reid DM, Ralston SH. Association of oestrogen receptor α gene polymorphisms with postmenopausal bone loss bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet* 2005;42:240-246.
66. Mizuguchi, T, Furuta I, Watanabe Y, Tsukamoto K, Tomita H, Tsujihata M, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Minakami H, Niikawa N, Yoshiura K. LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density. *J. Hum. Genet.* 2004;49: 80-86.
67. Qing W, Guang-Xing C, Lin G, Liu Y. The osteogenic study of tissue engineering bone with BMP2 and BMP7 gene-modified rat adipose-derived stem cell. *J Biomed Biotech.* 2012;410879. doi: 10.1155/2012/410879. Epub 2012 Jun 21.
68. Schulte C, Goebell H, Roher HD, Schulte KM. Genetic determinants of IL-6 expression levels do not influence bone loss in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2521–2528.
69. Todhunter CE, Sutherland-Craggs A, Bartram SA, et al. Influence of IL-6, COL1A1, and VDR gene polymorphisms on bone mineral density in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1579–1584.
70. Nemetz A, Toth M, Garcia-Gonzalez MA, et al. Allelic variation at the interleukin 1beta gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* 2001;49:644–649.
71. Kim JG, Kim JH, Kim JY, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007;14:913–918.
72. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2002;17:1245–1255.
73. Tarantino U, Iolascon G, Cianferotti L, Masi L, Marcucci G, Giusti F, Marini F, Parri S, Feola M, Rao C, Piccirilli E, Zanetti EB, Cittadini N, Alvaro R, Moretti A, Calafiore D, Toro G, Gimigliano F, Resmini G, Brandi ML. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J Orthop Traumatol.* 2017 Nov;18(Suppl 1):3-36.
74. Forbes A, Escher J, Hebutterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, Shamir S, Stardelova K, Wierdsma N, Wiskin A. E, Bischoff S. C. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition.* 2017; 36: 321-334.
75. Buczkowski K, Chlabicz S, Horst-Sikorska W, Jaroszyński A, Siebert J, Tałałaj M, Ignaszak-Szczepaniak M, Kardas P. Osteoporoza. Postępowanie profilaktyczne, diagnostyczne i lecznicze. Wytyczne dla lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej. *Forum Medycyny Rodzinnej.* 2012;6; 4: 153-160.
76. Peat ID, Healy S, Reid DM, Ralston SH. Steroid induced osteoporosis: an opportunity for prevention? *Ann Rheum Dis.* 1995;54: 666-668.

77. Walsh LJ, Wong CA, Pringle M, Tattersfield AE. Use of oral corticosteroids in the community and prevention of secondary osteoporosis: a cross sectional study. *Br Med. J.* 1996; 313; 344-346.
78. Van Assche G, Dignass A, Reisch W et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohn's Colitis.* 2010;4; 63-101.
79. Farfay FA, Melmed GY, Lichtenstein GL, Kane SV. ACG Clinical Guideline: Preventive Care in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2017; 112:241–258; doi: 10.1038/ajg.2016.537 ; published online 10 January 2017.
80. Jarosz M., Bułhak-Jachymczyk B. Normy żywienia człowieka. Podstawy prewencji otyłości i chorób niezakaźnych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
81. Grygiel-Górniak B, Pawlak-Buś K, Leszczyński P. Sposób żywienia zapewniający optymalną podaż wapnia i witaminy D3. *Przegląd Menopauzalny* 2012;6:501-505.
82. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the pathologic consequences. *Science*, 1980;210:203-205.
83. Ryżko J. Gospodarka wapniowo-fosforanowa w stanach fizjologii i patologii układu pokarmowego. *Pediatra współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2001;3;2,111-117.
84. Płudowski P, Karczmarewicz E, Chlebna-Sokół D, Czech-Kowalska J, Dębski R, Dobrzańska A, Franek E, Głuszko P, Konstantynowicz J, Książyk JB, Książopolska-Orłowska K, Lewiński A, Litwin M, Lorenc RS, Łukaszewicz J, Marcinkowska-Suchowierska E, Milewicz A, Misiorowski W, Nowicki M, Rozentryt P, Socha P, Solnica B, Szalecki M, Tałałaj M, Żmijewski. Witamina D: Rekomendacje dawkowania w populacji osób zdrowych oraz w grupach ryzyka deficytów-wytyczne dla Europy Środkowej 2013 r. *Standardy Medyczne. Pediatria.*2013;10:573-578.
85. Van Schoor NM, Lips P. Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:671-680.
86. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:53-58.
87. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-281.
88. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008;87;4:1080-1086.
89. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, Pierroz DD, Weber P, Hoffmann K. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *British Journal of Nutrition.* 2014;111:23-45.
90. Holick MF. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:353-373.
91. Bruyere O, Malaise O, Neuprez A, Collette J, Reginsteri JY. Prevalence of vitamin D inadequacy is high in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(8):1939-1944.

92. Kmieć P, Żmijewski M, Waszak P, Sworczak K, Lizakowska-Kmieć M. Vitamin D deficiency during winter months among an adult, predominantly urban, population in Northern Poland. *Endokrynol Pol* 2014;65:105-113.
93. Phudowski P, Konstantynowicz J, Jaworski M, Abramowicz P, Ducki Cz. Ocena stanu zaopatrzenia w witaminę D w populacji osób dorosłych w Polsce. *Standardy Medyczne/Pediatrics*. 2014;11:609-617.
94. Lee JM, Smith JR, Philip BL, Chen TC, Mathieu J, Holick MF. Vitamin D deficiency in healthy group of mothers and newborn infants. *Clin Pediatr (Phila)* 2007;46:42-44.
95. Tuchendler D, Bolanowski M. Sezonowość zmian stężeń witaminy D w organizmie człowieka. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2010;6 (1):36-41.
96. Andersen R, Molgaard C, Skovgaard L, Brot C, Cashman KD, Chabros E, Charzewska J, Flynn A, Jakobsen J, Kärkkäinen M, Kiely M, Lamberg-Allardt C, Moreiras O, Natri AM, O'Brien M, Rogalska-Niedzwiedz M, Ovesen L. Teenage girls and elderly women living in northern Europe have low winter vitamin D status. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59:533-541.
97. Palmer MT, Weaver CT. Linking vitamin D deficiency to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(10):2245-2256.
98. Siffledeen JS, Simonski K, Steinhart H, Greenberg G, Fedorak RN. The frequency of vitamin D deficiency in adults with Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 2003;17(8):474-478.
99. Jahnsen J, Falch JA, Mowickel P, Aadland E. Vitamin D status, parathyroid hormone and bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(2):192-199.
100. Driscoll RH Jr, Meredith SC, Sitrin M, Rosenberg IH. Vitamin D deficiency and bone disease in patients with Crohn disease. *Gastroenterology* 1982;83:1252-1258.
101. Holick MF, Binkley NC, Bishoff-Ferrar HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1911-1930.
102. MacLaughlin J, Holick MF: Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 1985;76:1536-1538.
103. Clements TL, Henderson SL, Adams JS, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesis vitamin D3. *Lancet*. 1982;1:74-76.
104. Matsoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:1165-1168.
105. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem*. 2003;88:296-307.
106. Marcinkowska-Suchowierska E. Leczenie deficytów witaminy D u osób dorosłych w grupach ryzyka – „terapia szyta na miarę”. *Standardy Medyczne. Pediatrics*. 2012;9:716-721.
107. Lo CW, Paris PW, Clements TL, Nolan J, Holick MF. VD absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *Am J Clin Nutr*. 1985;42:644-649.

108. Vaishya R, Vijay V, Agrawal AK. Resurgence of vitamin D: Old vine in new bottle. *J Clin Orthop Trauma*. 2015;6(3):173-83. doi: 10.1016/j.jcot.2015.02.002. Epub 2015 Mar 26.
109. Pack AM, Morrel MJ. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy Behav*. 2004;5(suppl 2):24-29.
110. Zhang Y, Zhang X, Wang F i wsp. The relationship between obesity indices and serum vitamin D levels in Chinese adults from urban settings. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25(2): 333-9. doi: 10.6133/apjcn.2016.25.2.15
111. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000 Sep;72(3): 690-693.
112. Liu X, Xian Y, Min M, Dai Q et al. Association of 25-hydroxyvitamin D status with obesity as well as blood glucose and lipid concentrations in children and adolescents in China. *Clin Chim Acta*. 2016;455:64-67. doi:10.1016/j.cca.2016.01.023. Epub 2016 Jan 26.
113. Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG et al. Diabetes. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. 2010;59(1): 242-8. doi: 10.2337/db09-1011. Epub 2009 Oct 15.
114. Areh J, Narra S, Nair S. Prevalence of VDD in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*. 2010;55:2624-2628.
115. Grenda R. Witamina D w przewlekłej chorobie nerek w wieku rozwojowym. *Standardy Medyczne. Pediatria*. 2012;9:665-669.
116. McCarthy D, Duggan P, O'Brien M, Kiely M, McCarthy J, Shanahan F, Cashman KD. Seasonality of vitamin D status and bone turnover in patients with Crohn disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;211;1073-1083.
117. Vogelsang H, Schofl R, Tillinger W, Ferenci P, Gangl A. 25-hydroxyvitamin D absorption in patients with Crohn's disease and with pancreatic insufficiency. *Wien Klin Wochenschr*. 1997;109:678-682.
118. Clements MR, Chalmers TM, Fraser DR. Enteropathic circulation of vitamin D: a reappraisal of the hypothesis. *Lancet*. 1984;1:1376-1379.
119. Mouli VP, Ananthakrishnan AN. Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:125-136.
120. Braumbaugh PF, Haussler MR. $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. Association of $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem*. 1974;249:1251-1257.
121. Haussler MR, Norman A. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969; 62: 155-162.
122. Nagpal S, Na S. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Rev* 2005;26:662-687.
123. Gniadecki R. Nongenomic signaling by vitamin D: a new face of Src. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:1273-1277.
124. Haussler MR, Jurutka PW, Hsieh JC. i wsp. New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone*, 1995; 17: 33-38.
125. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:1678-1688.

126. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*, 1979; 206: 1188-1190.
127. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *BioEssays*, 2008; 26, 21-28.
128. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnethi L, Handel AE, Disanto G, Orton SM, Watson CT, Morahan JM, Giovannoni G, Ponting CP, Ebers GC, Knight JC. A ChIP-sequence defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.*, 2010; 20: 1352–1360.
129. Tukaj C. Adequate level of vitamin D is essential for maintaining good health. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2008; 62: 502–510.
130. Wacker M, Holick MF. Vitamin D – effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*, 2013; 10: 111–148.
131. Holick M. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 80: 1678–1686.
132. Fludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, Shoenfeld Y, Lerchbaum E, Llewellyn DJ, Kienreich K, Soni Mi. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—A review of recent evidence. *Autoimmun Rev.* 2013;12(10):976-89. doi: 10.1016/j.autrev.2013.02.004. Epub 2013 Mar 28.
133. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, O'Loughlin PD, Morris HA. Metabolism of vitamin D₃ in human osteoblasts: evidence of autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Bone* 2007;40,1517-1528.
134. Kogawa M, Findlay DM, Anderson PH, Ormsby R, Vincent C, Morris HA, Atkins GJ. Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D₃: a potential mechanism for optimization of bone resorption. *Endocrinology* 2010, 151, 4613-4625.
135. Walicka M, Czerwińska E, Marcinkowska-Suchowierska E. Witamina D – wpływ na kość. *Postępy Nauk Medycznych* 2012;3,232-236.
136. Mezquita RP, Munoz TM, Lopez RF, et al. Prevalence of vitamin D deficiency in populations at risk for osteoporosis: impact on bone integrity. *Med Clin* 2002;119:85-89.
137. Haderslev KV, Jeppesen PB, Sorensen HA, Mortensen PB, Staun M. Vitamin D status and measurements of markers of bone metabolism in patient with small intestinal resection. *Gut* 2003;52:653-658.
138. Hesse I, Mosekilde L, Melsen F, Fasth S, Hulten L, Lund B, Sorensen OH. Osteopenia with normal vitamin D metabolites after small-bowel resection for Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1984;19:691-696.
139. Kuryłowicz A, Bednarczuk T, Nauman J. Wpływ niedoboru witaminy D na rozwój nowotworów i chorób autoimmunologicznych. *Endokrynol Pol* 2007;58(2):140-152.
140. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med* 2010;88:441-450.

141. Cantorna TM, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004;80(suppl),1717-1720.
142. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ has effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167;9:4974-4980.
143. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(1):23-33.
144. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cellular and Molecular Biology* 2003;49(2):1-24.
145. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* 2010;10:482-496.
146. Cantorna MT. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 2010;69(3):286-289.
147. Kamen DL, Tangpricha V. VitaminD and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med.* 2010;88:441-450.
148. Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25 Dihydroxycholecalciferol prevents and amelirates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J. Nutr.* 2000;130(11):2648-2652.
149. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role of vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003;17:2386-2392.
150. Bours PHA, Wienders JPM, Vermeijden JR, Van de Viel A. Seasonal variation of serum 25-hydroxyvitamin D levels in adult patients with IBD. *Osteoporos Int* 2011;22(11):2857-2867.
151. Tilg H, Moschen AR, Kaser A, Pines A, Dotan I. Gut, inflammation and osteoporosis. *Gut.* 2008;57(5):684-94. doi: 10.1136/gut.2006.117382.
152. Jorgensen S, Hvas C, Agnholt J. et al. Vitamin D deficiency in active Crohn's disease. *Digestive Diseases Week (Abstract);* 2008.
153. Miheller P, Muzes G, Hritz I, Lakatos G, Pregun I, Lakatos PL, Herszényi L, Tulassay Z. Comparison of the effect of 1,25 Dihydroxyvitamin D and 25 hydroxyvitamin D on bone pathology and disease activity in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1656-1662.
154. Narula N, Marshall JK. Management of inflammatory bowel disease with vitamin D: Beyond bone health. *Jounal of Crohn's and Colitis (JCC)* 2012;6:397-404.
155. Gorham E, Garland C, Garland F, Grant W, Mohr S, Lipkin M, Newmark HL, Giovannucci E, Wei M, Holick MF . Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantative analysis. *Am J Prev Med.* 2007;32:210-216.
156. Ananthakrishnan A, Cagan A, Gainer VS, Cai T, Cheng S, Savova G, Chen P, Szolovits P, Xia Z, De Jager P, Shaw SY, Churchill S, Karlson EW, Kohane I, Plenge RM, Murphy SN, Liao KP. Normalization of Plasma 25-hydroxy Vitamin D is Associated with Reduced Risk of Surgery in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.*2013;19(9):1921-1927.

157. Vieth R, Kimball S, Hu A, Walfish P. Randomized comparison of the effects of the vitamin D3 adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical responses and wellbeing of patients. *Nutr J* 2004;3:8.
158. Jorge R, Sneve M, Figenschau Y, Svartberg J, Waterloo K. Effects of vitamin D supplementation on symptoms of depression in overweight and obese subjects: randomized double blind trial. *J Intern Med.* 2008;264:599-609.
159. Baker AR, McDonnell DP, Hughes MR, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Shine J, Pike JW, O'Malley BW. Molecular cloning and expression of human vitamin D receptor complementary DNA: structural homology with thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3294-3298.
160. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molec. Endocr.* 1997;11:1165-1179.
161. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, Kesterson RA, Pike JW, Feldman D, O'Malley BW. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 1988;242:1702-1705.
162. Morand Grégoire B, Da Silva SD, Hier MP, Alaoui-Jamali Moulay A. Insights into Genetic and Epigenetic Determinants with Impact on Vitamin D Signaling and Cancer Association Studies: The Case of Thyroid Cancer *Front. Oncol.*, 04 November 2014 <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00309>.
163. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Mauers JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338:143-156.
164. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1850-1855.
165. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation codon: effect on protein activity and relations to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997;12(6): 915-921.
166. Jarutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol* 2000;14(3):401-420.
167. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relations to vitamin D related diseases states. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004;89-90:187-193.
168. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6665-6669.
169. Mohammadi Z, Fayyazbakhsh F, Ebrahimi M, Amoli MM, Khahayar P, Dini M, Zadeh R, Keshtkar A, Barikani HR. Association between vitamin D receptor gene

- polymorphisms (FokI and BsmI) and osteoporosis: a systematic review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2014;13:98.
170. Chen HY, Chen WC, Hsu CD, Tsai FJ, Tsai CH. Relation of vitamin D receptor FokI start codon polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal women in Taiwan. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:93-98.
 171. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1850-1855.
 172. Horst-Sikorska W, Wawrzyniak A, Celczyńska-Bajew L, Marcinkowska M, Dąbrowski S, Kalak R, Słomski R. Polimorfizm genu VDR – efektywny marker molekularny ryzyka osteoporotycznych złamań kości w grupie kobiet po menopauzie pochodzących z rejonu Wielkopolski. *Pol J Endocrinol* 2005;3(56):233-239.
 173. Drwęska-Matelska N. Polimorfizm genów metabolizmu tkanki kostnej a podatność na osteoporozę. Rozprawa doktorska. Poznań, 2013.
 174. Sainz J, Van Tornhout JM, Loro L, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent, *N. Engl. J. Med.* 1997;337:77–82.
 175. Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, Fielding LJ, Ridout R, Cole DEC. Determinants of peak bone mass in a young female canadian cohort, *J. Bone Miner. Res.* 1999;14:633–643.
 176. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amedei A, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Mavilia C, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP; APOSS Investigators; EPOS Investigators; EPOLOS Investigators; FAMOS Investigators; LASA Investigators; Rotterdam Study Investigators; GENOMOS Study. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: A participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2006; 145: 255-264.
 177. Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H, Marumo F. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese women. The Japanese population-based osteoporosis (JPOS) study. *Int J Epidemiol* 2004;33(5): 979-988.
 178. Noble CL, McCullough J, Ho W, Less CW, Nimmo E, Drummond H, Bear S, Hannan J, Millar C, Ralston SH, Satsangi J. Low body mass not vitamin D receptor polymorphisms predict osteoporosis with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:588-596.
 179. Pluskiewicz W, Zdrzałek J, Karasek D. Spine bone mineral density and VDR polymorphism in subject with ulcerative colitis. *J Bone Miner Metab* 2009;27:567-573.

180. Xue LN, Xu KO, Zhang W, Wang Q, Wu J, Wang XY. Association between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis* 2013;19:54-60.
181. Wang L, Wang ZT, Hu JJ, Fan R, Zhou J, Zhong J. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and risk of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* 2014;13(2)P:2598-2610.
182. Słomski R. Analiza DNA – Teoria i praktyka, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Poznań, 2011.
183. Francis RM, Harrington F, Tuner E, Papiha SS, Datta HK. Vitamin D receptor gene polymorphism in men and its effect on bone density and calcium absorption; *Clin Endocrinol. (Oxf)* 1997;46(1):83-86.
184. Kalak R. Przydatność analizy polimorfizmu genów metabolizmu tkanki kostnej w diagnostyce podatności na osteoporozę w populacji polskiej. Rozprawa doktorska. 2005.
185. Black GM, Wahner HW, Fogelman I. The evaluation of osteoporosis: dual energy X-ray absorptiometry and ultrasound in clinical practice. Martin Dunitz Ltd, London 1999.
186. Czerwiński E. Zasady rozpoznawania osteoporozy. *Medycyna po Dyplomie*. 2005;5(14):141-148.
187. Czerwiński E. Osteoporoza problem interdyscyplinarny. PZWL, Warszawa 2015, 59-63.
188. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amedei A, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Mavilia C, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP; APOSS Investigators; EPOS Investigators; EPOLOS Investigators; FAMOS Investigators; LASA Investigators; Rotterdam Study Investigators; GENOMOS Study. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006;145:255-64.
189. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284-287.
190. Mohammadi Z, Fayazbakhsh F, Ebrahimi M, Amoli MM, Khashayar P, Dini M, Zadeh RN, Keshtkar A, Barikani HR. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI and BsmI) and osteoporosis: a systematic review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2014;13:98 doi:10.1186/s40200-014-0098-x
191. Mijač DD, Janković GL, Jorga J, Krstić MN. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. *Eur J Intern Med* 2010; 21:315-319
192. Zawadzka P, Grzymisławski M. Ocena występowania stanu niedożywienia u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Gastroenterol Pol* 2006;13:449-453.

193. Hassan V, Hassan S, Seyed-Javad P, Ahmad K, Asieh H, Maryam S, Farid F, Siavash A.. Association between serum 25 (OH) Vitamin D concentrations and inflammatory bowel diseases (IBDs) activity. *Med. J Malaysia*. 2013;68:34-38.
194. Lu C, Yang J, Yu W, Li D, Xiang Z, Lin Y, Xiang Z, Lin Y, Yu C. Association between 25(OH)D Level, Ultraviolet Exposure, Geographical Location, and Inflammatory Bowel Disease Activity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2015;10(7): e0132036. doi:10.1371/journal.pone.0132036
195. Del Pinto R, Pietropaoli D, Chandar AK, Ferri C, Cominelli F. Association between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2708–2717. doi:10.1097/MIB.0000000000000546.
196. Pappa HM, Gordon CM: Vitamin D status in children and young adults with inflammatory bowel disease. *Pediatric* 2006;118:1950-1961.
197. Fu YT, Chatr N, Cheong-Lee C, Salh B. Hypovitaminosis D in adults with inflammatory bowel disease: potential role of ethnicity. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2144-8.
198. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporos Int* 2009;20:935-942.
199. Tajika M, Matsuura A, Nakamura T, Suzuki T, Sawaki A, Kato A, Hara K, Ookubo K, Yamao K, Kato M, Muto Y. Risk factors for vitamin D deficiency in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 2004;39:527-533.
200. Suibhne TN, Cox G, Healy M, O'Morain C, O'Sullivan M. Vitamin D deficiency in Crohn's disease: Prevalence, risk factors and supplement use in an outpatient setting. *Journal of Crohn and Colitis*. 2012;6:182-188.
201. Mithal A, Wahl DA, Bonjour J-P, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, El-Hajj Fuleihan G, Josse RG, Lips P, Morales-Torres. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis Int*. 2009;20:1807-1820. (on behalf of the IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group)).
202. Sedrani SH. Low 25-hydroxyvitamin D and normal serum calcium concentrations in Saudi Arabia:Riyadh region. *Ann Nutr Metab* 1984;28:181-185.
203. Pludowski P, Grant WB, Bhattoa HP, Bayer M, Povoroznyuk V, Rudenka E, Ramanau H, Varbiro S, Rudenka A, Karczmarewicz E, Lorenc R, Czech-Kowalska J, Konstantynowicz J. Vitamin D Status in Central Europe. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2014 (2014), Article ID 589587, 12 pages. doi:10.1155/2014/589587.
204. Pludowski P, Ducki C, Konstantynowicz J, Jaworski M. Vitamin D status in Poland. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(7-8):530-539).
205. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2014;144:138-145.
206. Vanlint S. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 2013;5(3):949–956.
207. Krasińska A, Skowrońska B. Znaczenie witaminy D u pacjentów z nadmierną masą ciała - nowe zasady suplementacji. *Forum Zaburzeń Metabolicznych* 2014;5(2):63–70.

208. Pallav K, Riche D, May WL, Sanchez P, Gupta NK. Predictors of vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease and health: A Mississippi perspective. *World J Gastroenterol*. 2017;23(4):638-645.
209. Rosenstreich S, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: Evidence for a storage site in the rat. *J. Clin. Invest*. 1971;50(3): 679–687.
210. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, Saltzman E, Dawson-Hughes B. Vitamin D3 in fat tissue. *Endocrine* 2008;33:90–94.
211. Lim H, Jong Kim H, Hong SJ, Kim S. Nutrient intake and bone mineral density by nutritional status in patients with inflammatory bowel disease. *J Bone Metab*. 2014;21:195-203.
212. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet*. 1989;2:1104-1105.
213. Gloth FM, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG, Tobin JD. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA*. 1995;274:1683-1686).
214. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2001;22:477-501.
215. Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadvorna Y, Binion DG, Issa M. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35:308-316.
216. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Oav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med*. 2004;116:634-639.
217. Bhattoa HP, Bettembuk P, Ganacharya S. et al. Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal Hungarian women. *Osteoporos Int*. 2004;15:195-198.
218. Hosseinpah F, Rambod M, Hossein-nejad A, Larijani B, Azizi F. Association between vitamin D and bone mineral density in Iranian postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:86-92.
219. Akhter N, Sinnott B, Mahmood K, Rao S, Kukreja S, Barengolts E. Effects of vitamin D insufficiency on bone mineral density in African American men. *Osteoporos Int*. 2009;20:745-750.
220. Garnero P, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Associations of vitamin D status with bone mineral density, bone turnover, bone loss and fracture risk in healthy postmenopausal women. The OFELY study. *Bone*. 2007;40:716-722.
221. Allali F, El Aichaouis S, Khazani H, Benyahia B, Saoud B, El Kabbaj S, Bahiri R, Abouqal R, Hajjaj-Hassouni N. High prevalence of hypovitaminosis D in Morocco: Relationship to lifestyle, physical performance, bone markers, and bone mineral density. *Semin Arthritis Rheum*. 2009;38:444-451.
222. Ezzat Y, Hamdy K. The frequency of low bone mineral density and its associated risk factors in patients with inflammatory bowel diseases. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2010;13:259-265.

223. Andreassen H, Rix M, Brot C, Eskildsen P. Regulators of calcium homeostatis and bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33:1087-1093.
224. Vogelsang H, Ferenci P, Woloszczuk W, Resch H, Herold C, Frotz S, Gangl A. Bone disease in vitamin D-deficient patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1989;34:1094-1099.
225. Krzesiek E, Iwańczak B, Blitek A, Jędrzejuk D. Assessment of Mineral Density of Bones, Active Metabolites of Vitamin D3 in Serum in Ulcerative Colitis and Crohn Disease in Children. *Adv Clin Exp Med.* 2005;14;2:251-260.
226. Silvennoinen J. Relationship between vitamin D, parathyroid hormone and bone mineral density in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 1996;239:131-137.
227. Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, Buxton-Thomas M, Forgacs I, Moniz C. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1997;40:228-233.
228. Pollak RD, Karameli F, Eliakim R, Ackerman Z, Tabb K, Rachmilewitz D. Femoral neck osteopenia in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(9):1483-1490.
229. Habtezion A, Silverberg MS, Parkes R, Mikolainis S, Steinhart AH. Risk factors for low bone density in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8:87-92.
230. 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. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:824-828.
231. Schoon EJ, Blok BM, Geerling BJ, et al. Bone mineral density in patients with recently diagnosed inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2000;119:1203-1208.
232. Ismail MH, Al-Elq AH, Al-Jarodi ME, Azzam NA, Aljebreen AM, Al-Momen SA, Bseiso BF, Al-Mulhim FA, Alquorain A. Frequency of low bone mineral density in Saudi patients with inflammatory bowel disease. *The Saudi Journal of Gastroenterology.* 2012;18(3):201-207.
233. De Silva AP, Karunanayake AL, Dissanayaka TGI., Dassanayake AS, Duminda HKKT, Pathmeswaran A, Wickramasinghe AR, De Silva HJ. Osteoporosis in adult Sri Lankan inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol.* 2009;15(28):3528-3531.
234. Silvennoinen JA, Karttunen TJ, Niemela SE et al. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1995;37:71-76.
235. 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;107:1031-1039.
236. Bianchi ML. Inflammatory bowel diseases, celiac disease, and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503:54-65.
237. Zali M, Bahari A, Firouzi F, Daryani NE, Aghazadeh R, Emam MM, et al. Bone mineral density in Iranian patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:758-766.
238. Etzel JP, Larson MF, Anawalt BD, Collins J, Dominitz JA. Assessment and management of low bone density in inflammatory bowel disease and performance

- of professional society guidelines. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(10):2122-2129. doi: 10.1002/ibd.21601. Epub 2011 Jan 13.
239. Frei P, Fried M, Hungerbuhler V, Rammert C, Rousson V, Kullak-Ublick GA. Analysis of risk factors for low bone mineral density in inflammatory bowel disease. *Digestion*. 2006;73:40-46.
 240. Atreja A, Aggarwal A, Licata AA, Lashner BA. Low body mass index can identify majority of osteoporotic Inflammatory Bowel Disease Patients Missed by Current Guidelines. *The Scientific World Journal*. 2012;Article ID 807438, 6 pages doi:10.1100/2012/807438.
 241. Pigot F, Roux C, Chaussade S, Hardelin D, Pelleter O, Montbrun T, Listrat V, Dougados M, Couturier D, Amor B. Low Bone Mineral Density in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Disease and Sciences*. 1992;37:1396-1403.
 242. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, McClung M, Hosking D, Yates AJ, Christiansen C. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1622–1627.
 243. Dytfeld J., Horst-Sikorska W. Zespół metaboliczny a kość. *Endokrynologia Polska*. 2009;60:477-482.
 244. De Laet C, Kanis JA, Odén A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, Eisman JA, Kroger H, Fujiwara S, Garnero P, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ 3rd, Meunier PJ, Pols HA, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteop Int* 2005;16:1330–1338.
 245. Reid IR, Ames R, Evans MC, Sharpe S, Gamble G, France JT, Lim TM, Cundy TF. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women — a key role for fat mass. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:45–51.
 246. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd.. Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Miner Res*. 1996;11:857–863.
 247. Reid IR, Plank LD, Evans MC. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:779–782.
 248. Douchi T, Yamamoto S, Oki T, Maruta K, Kuwahata R, Nagata Y.. Relationship between body fat distribution and bone mineral density in premenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol*. 2000; 95:722–725.
 249. Deng HW, Deng H, Liu YJ, Liu YZ,1, Xu FH, Shen H, Conway T, Li JL, Huang QL, Davies KM, Recker RR. A genomewide linkage scan for quantitative trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1138–1151.
 250. Zhao LJ, Guo YF, Xiong DH, et al. Is a gene important for bone resorption a candidate for obesity? An association and linkage study on the RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) gene in a large Caucasian sample. *Hum Genet* 2006;120:561–570.
 251. Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut*. 2000;47:211-214.

252. Hughes DJ, McManus R, Neary P, O'Morain C, o'Sullivan M. Common variation in the vitamin D receptor gene and risk of inflammatory bowel disease in an Irish case-control study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2011;23(9):807-812.
253. Dresner-Pollak ., Ackerman Z, Eliakim R, Karban A, Chowers Y, Fidler HH. The BsmI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in Jewish Ashkenazi patients. *Genetic Testing*. 2004;8(4):417-420.
254. Martin K, Radlamyr M, Borchers R, Heinzlmann M, Folwaczny C. Candidate genes colocalized to linkage regions in inflammatory bowel disease. *Digestion*. 2002;66(2):121-126.
255. Carvalho AYOM, Bishop KS, Han DY, Ellett S, Jesuthasan A, Lam WJ, Ferguson LR. The role of vitamin D level and related single nucleotide polymorphisms in Crohn's Disease. *Nutrients*. 2013;5:3898-3909.
256. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J. Clin. Invest*. 1994;94:2130-2134.
257. Langdahal BL, Gravhold CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphism in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000;30:608-617.
258. Arrai H, Miyamoto KI, Yamamoto H, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relations to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997,12,915-921.
259. Harris SS, Eccleshall T, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997,12:1043-1048.
260. Williams FM, Spector TD. Recent advances in the genetics of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(1):27-35.

10. Spis tabel

Tabela 1. Różnice kliniczne między chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) a wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG).....	9
Tabela 2. Ocena stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25(OH)D w surowicy	23
Tabela 3. Zestawienie polimorfizmów genu receptora witaminy D (VDR) analizowanych w niniejszej rozprawie	34
Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej	39
Tabela 5. Sekwencje nukleotydowe stosowanych starterów	42
Tabela 6. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów	42
Tabela 7. Zestawienie warunków analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)	43
Tabela 8. Porównanie badanych chorych i osób z grupy kontrolnej pod względem analizowanych parametrów	48
Tabela 9. Gęstość mineralna kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa u pacjentów z badanych grup	50
Tabela 10. Gęstość mineralna kości w obrębie szyjki kości udowej u pacjentów z badanych grup	51
Tabela 11. Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D w badanych grupach	52
Tabela 12. Stężenie witaminy D a cechy morfologiczne i gęstość mineralna kości w grupach badanych	53
Tabela 13. Gęstość mineralna kości a cechy morfologiczne w grupach badanych	54
Tabela 14 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	57
Tabela 14 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) między badanymi grupami	57
Tabela 15 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	58
Tabela 15 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) między badanymi grupami	58
Tabela 16 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	59
Tabela 16 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) między badanymi grupami	59

Tabela 17 A. Rozkład alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) w grupie chorych i w grupie kontrolnej	60
Tabela 17 B. Porównanie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) między badanymi grupami	60
Tabela 18. Porównanie genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach badanych	62
Tabela 19. Porównanie genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach	63
Tabela 20. Porównanie genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach	65
Tabela 21. Porównanie genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C) pod względem BMD, T score, Z score i 25OHD w poszczególnych grupach	67
Tabela 22. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu FokI (rs2228570, c.2T>C)	70
Tabela 23. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu BsmI (rs1544410, 1025-49G>A)	78
Tabela 24. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu ApaI (rs7975232, 1024+289G>T)	85
Tabela 25. Porównanie grup badanych pod względem BMD, T score, Z score w odniesieniu do genotypów polimorfizmu TaqI (rs731236, c.1056T>C)	94

11. Spis rycin

Rycina 1. Schemat lokalizacji genu VDR w chromosomie 12 (12q13.11)	32
Rycina 2. Schemat organizacji genu receptora witaminy D (VDR) na podstawie Morand G.B i wsp.	33
Rycina 3. Wynik badania densytometrycznego kręgosłupa lędźwiowego	46
Rycina 4. Wynik badania densytometrycznego bliższego końca kości udowej	46
Rycina 5. Gęstość mineralna kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2-L4) u pacjentów z badanych grup (rozkład procentowy)	50
Rycina 6. Gęstość mineralna kości w szyjce kości udowej (SKU) u pacjentów z badanych grup (rozkład procentowy)	51
Rycina 7. Stan zaopatrzenia organizmu w witaminę D w badanych grupach (rozkład procentowy)	52
Rycina 8. Z score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 Z score) dla grupy kontrolnej (GK) w podgrupach o różnym wariancie polimorfizmu ApaI genu VDR	67
Rycina 9. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm ²)) dla pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) w podgrupach o różnym wariancie polimorfizmu TaqI genu VDR	70
Rycina 10. Gęstość mineralną szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm ²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą FF	73
Rycina 11. T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą FF	74
Rycina 12. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Ff	75
Rycina 13. T score dla gęstości szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Ff	76
Rycina 14. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff	77
Rycina 15. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą ff	78

Rycina 16. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD g/cm ²) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb	81
Rycina 17. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Bb	82
Rycina 18. Gęstość mineralna odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm ²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą bb	83
Rycina 19. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb	84
Rycina 20. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą bb	85
Rycina 21. Gęstość mineralna kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm ²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa	88
Rycina 22. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa	89
Rycina 23. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm ²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa	90
Rycina 24. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Aa	91
Rycina 25. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa	92
Rycina 26. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa	93
Rycina 27. Z score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU Z score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą aa	94

Rycina 28. Gęstość mineralna kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 BMD (g/cm²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT 97

Rycina 29. T score dla gęstości mineralnej odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L2-L4 T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT 98

Rycina 30. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących homozygotą TT 99

Rycina 31. Gęstość mineralna szyjki kości udowej (SKU BMD (g/cm²)) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt 100

Rycina 32. T score dla gęstości mineralnej szyjki kości udowej (SKU T score) w grupie kontrolnej (GK) oraz w grupach pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (LC) będących heterozygotą Tt 101