

Zofia Ostrowska<sup>1</sup>, Beata Kos-Kudła<sup>2</sup>, Bogdan Marek<sup>2</sup>, Dariusz Kajdaniuk<sup>2</sup>, Bożena Szapska<sup>1</sup>, Kinga Wołkowska-Pokrywa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Klinicznej Katedry Biochemii w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

<sup>2</sup>Katedra Patofizjologii i Endokrynologii w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

# Okołodobowe stężenia DHEA a stan kości u otyłych kobiet po menopauzie

Circadian concentrations of DHEA and bone status in postmenopausal obese women

Praca finansowana z umowy nr KNW-2-115/10

## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Istnieją sugestie, że zwiększone wytwarzanie dehydroepiandrosteronu (DHEA) u otyłych kobiet po menopauzie może wpływać na tkankę kostną, a istotną rolę w mechanizmie tych powiązań mogą odgrywać osteoprotegeryna (OPG) i jej ligand — RANKL. Celem badań było wykazanie, czy u otyłych kobiet po menopauzie istnieje związek między okołodobowymi stężeniami DHEA a gęstością mineralną kości (BMD) i metabolizmem kostnym oraz ustalenie, czy OPG i RANKL mogą mieć znaczenie w mechanizmie tych zależności.

**MATERIAŁ I METODY.** U 35 kobiet po menopauzie (20 otyłych i 15 zdrowych) wykonano badanie BMD metodą dwuwiązkowej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA) obejmujące część lędźwiową kręgosłupa L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> oraz, metodą ELISA, oznaczono stężenia DHEA, markerów kostnych (OC i CTx), OPG i jej rozpuszczalnego liganda sRANKL w surowicy krwi pobieranej w odstępach 3-godzinnych w ciągu doby.

**WYNIKI.** Istotnemu zwiększeniu masy ciała, wskaźnika masy ciała (BMI), wskaźnika talia-biodra (WHR) i BMD u otyłych kobiet towarzyszyło istotne zwiększenie średniodobowego stężenia i amplitudy okołodobowych oscylacji DHEA, obniżenie średniodobowych stężeń OC, CTx, OPG, sRANKL i amplitudy rytmów OC, CTx, OPG,

sRANKL oraz przesunięcie akrofazy rytmu sRANKL. Wykazano dodatnią korelację między BMD a DHEA i wskaźnikiem OPG/sRANKL oraz ujemną z sRANKL. Okołodobowe stężenia DHEA korelowały ujemnie z OC, CTx i sRANKL, a dodatkowo — z OPG i wskaźnikiem OPG/sRANKL. Stwierdzono ujemną korelację między okołodobowymi stężeniami sRANKL a OC i OPG.

**WNIOSKI.** Otyłość u kobiet po menopauzie prowadzi do wzrostu okołodobowego wydzielania DHEA, któremu towarzyszy zwiększenie BMD, zmniejszenie metabolizmu kostnego oraz supresja okołodobowych oscylacji OPG i sRANKL. Zwiększone wydzielanie DHEA u otyłych kobiet po menopauzie może korzystnie wpływać na tkankę kostną, najprawdopodobniej poprzez przesunięcie relacji OPG do sRANKL na rzecz OPG.

**Słowa kluczowe:** DHEA, BMD, OPG, sRANKL, otyłe kobiety, menopauza

Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2011, tom 7, nr 4, 197-207

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** It has been suggested that increased DHEA secretion in postmenopausal obese women might affect bone tissue; the association might be significantly influenced by OPG and its ligand, RANKL. The aim of the study was to determine whether postmenopausal obese women showed any relationship between circadian concentrations of DHEA and BMD and bone metabolism, and to establish whether OPG and RANKL might play a role in the relationship.

**MATERIAL AND METHODS.** Thirty-five postmenopausal women (20 obese and 15 healthy individuals) underwent BMD of the lum-

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Zofia Ostrowska  
Zakład Biochemii Klinicznej  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze  
tel.: 32 275 51 35  
e-mail: ozdrasiek@wp.pl  
Copyright © 2011 Via Medica  
Nadesłano: 17.06.2011      Przyjęto do druku: 30.09.2011

bar spine (L<sub>2</sub>–L<sub>4</sub>) by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA); serum DHEA, bone markers (OC and CTx), OPG and its soluble ligand sRANKL levels were determined by ELISA in serum samples collected every three hours.

**RESULTS.** A significant increase in body mass, BMI and WHR indices and BMD in obese women was accompanied by a significant increase of mean circadian concentration of DHEA, and a decrease of mean circadian concentrations of OC, CTx, OPG, and sRANKL. The amplitudes of OC, CTx, OPG and sRANKL rhythms were also decreased, and a shift was observed in sRANKL rhythm acrophase. Positive correlations were revealed between BMD and DHEA and OPG/sRANKL ratio. A negative correlation was found between BMD and sRANKL. Circadian concentrations of DHEA were negatively correlated with OC, CTx and sRANKL and positively with OPG and OPG/sRANKL ratio. A negative correlation was seen between circadian concentrations of sRANKL and OC and OPG.

**CONCLUSIONS.** Postmenopausal obesity results in elevation of circadian DHEA secretion associated with increased BMD, decreased bone metabolism, and suppression of circadian OPG and sRANKL oscillations. Increased DHEA secretion in postmenopausal obese women may beneficially affect bone tissue most probably via a shift in the OPG/RANKL ratio that tilts the balance toward a functional excess of OPG.

**Key words:** DHEA, BMD, OPG, sRANKL, obese women, menopause

Endocrinology, Obesity and Metabolic Disorders 2011, vol. 7, No 4, 197–207

## Wstęp

U otyłych kobiet w wieku pomenopauzalnym obserwuje się wzrost stężenia krążących we krwi androgenów, zwłaszcza nadnerczowych (w tym głównie dehydroepiandrosteronu — DHEA i jego siarczanu — DHEAS) w stosunku do kobiet szczupłych w porównywalnym wieku [1–3]. Istnieją sugestie, że zmiany te mogą mieć znaczenie w mechanizmie chroniącym otyłe kobiety przed rozwojem osteoporozy po menopauzie [1–4]. Wykazano związek między masą ciała, wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) oraz wskaźnikiem talia–biodra (WHR, *waist-to-hip ratio*) a okołodobowymi stężeniami DHEAS i obrotem kostnym u otyłych kobiet w okresie pomenopauzalnym [1–3]. Wyniki badań *in vitro* z użyciem izolowanych osteoblastów wskazują, że DHEA w stężeniach równych 0,01  $\mu$ M lub większych, szczególnie w zakresie stężeń 0,1–1  $\mu$ M, powoduje wzrost wartości wskaźnika mRNA osteoprotegeryna/mRNA ligand receptora aktywatora czynnika jądrowego  $\kappa$ B (mRNA OPG/mRNA RANKL) w osteoblastach [5]. W badaniach na izolowanych osteoklastach stwierdzono, że DHEA zmniejsza liczbę i powierzchnię jamek resorpcyjnych wyłącznie w obecności osteoblastów [5]. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że wpływ DHEA na tkankę kostną może być realizowa-

ny za pośrednictwem, wytwarzanych głównie w osteoblastach i komórkach zrębu szpiku, cytokin systemu RANKL/RANK (receptor aktywator czynnika jądrowego  $\kappa$ B)/OPG [2, 6]. Należący do nadrodziny czynników martwicy guza (TNF, *tumor necrosis factor*) RANKL jest głównym stymulatorem tworzenia i dojrzewania osteoklastów; jest także niezbędny do ich przeżycia. Jest produkowany w kości przez osteoblasty i komórki zrębu szpiku, jednak ekspresję genu dla tego liganda stwierdzono również w komórkach innych tkanek, między innymi układu odpornościowego, takich jak limfocyty T i komórki dendrytyczne. RANKL łączy się ze specyficznym receptorem komórkowym RANK; ekspresję tego receptora wykazują tylko osteoklasty i ich komórki prekursorowe. Wzrost ekspresji RANKL prowadzi do nasilenia resorpcji tkanki kostnej i utraty masy kostnej [6–8]. Osteoprotegeryna jest rozpuszczalnym receptorem białkowym, należącym do nadrodziny receptorów dla TNF, syntetyzowanym przez osteoblasty lub komórki zrębu szpiku i uwalnianym do mikrośrodowiska [7, 8]. Transkrypty mRNA OPG stwierdzono także w komórkach limfoidalnych, nerkach, wątrobie i tarczycy oraz w wielu tkankach płodowych. Osteoprotegeryna jest swoistym receptorem–pułapką dla RANKL. Wiążąc się kompetycyjnie z RANKL, uniemożliwia jego łączenie z RANK. Prowadzi to do zahamowania końcowych stadiów osteoklastogenezy, zmniejszenia aktywności osteoklastów i w efekcie — do zmniejszenia puli aktywnych osteoklastów, co powoduje ograniczenie resorpcji kości [6–8].

Wpływ wielu hormonów i cytokin na przebudowę kości wiąże się ze zmianami równowagi OPG/RANKL [7–10]. Parathormon, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kortykosteroidy, prostaglandyna E<sub>2</sub>, interleukiny (IL): IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 i TNF- $\alpha$  zwiększają ekspresję RANKL i/lub obniżają ekspresję OPG, w następstwie czego dochodzi do zmniejszenia stosunku OPG/RANKL i w efekcie do nasilenia resorpcji kości. Natomiast estrogeny, androgeny, leptyna, melatonina, IL-13, interferon- $\gamma$ , transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, *transforming growth factor  $\beta$ 1*) i insulinopodobny czynnik wzrostu-I (IGF-I, *insulin-like growth factor I*) hamują ekspresję RANKL i/lub zwiększają ekspresję OPG, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia resorpcji kości [2, 6–10].

Mimo istotnej roli systemu RANKL/RANK/OPG w regulacji przebudowy kości oraz znaczenia wywoływanych przez różne czynniki osteotropowe (w tym głównie hormony) zaburzeń równowagi tego systemu w patomechanizmie osteoporozy [2, 9–16], niewiele jest prac dotyczących oceny powiązań między cytokinami tego systemu (OPG, a zwłaszcza RANKL) ze stanem kośćca u kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym [16–22]. Co więcej, niewiele jest danych dotyczących

wplywu otyłości na ewentualne relacje między OPG i RANKL a stanem kośćca u kobiet w okresie pomenopauzalnym, uwzględniających związane z otyłością zmiany w stężeniach hormonów osteotropowych, w tym androgenów, zwłaszcza nadnerczowych (tj. DHEA i/lub DHEAS) [2, 9, 10, 22]. Dlatego autorzy niniejszej pracy podjęli badania w tym zakresie u otyłych kobiet po menopauzie.

Należy podkreślić, że dotychczasowe badania u otyłych kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym, poświęcone analizie czynników wpływających na stan kośćca w tym okresie, przeprowadzano głównie na podstawie jednorazowych oznaczeń, co nie zawsze odzwierciedla aktualny stan okołodobowego metabolizmu kostnego [2]. W związku z tym, że stężenia OPG, RANKL i markerów kostnych podlegają okołodobowym oscylacjom [2, 9, 10, 22], zasadne wydało się przeprowadzenie badań w aspekcie chronobiologicznym.

Celem badań było: 1) wykazanie, czy u kobiet po menopauzie istnieje związek między okołodobowymi stężeniami DHEA a gęstością mineralną kości (BMD, *bone mineral density*), ocenianą w badaniu części lędźwiowej kręgosłupa L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> metodą dwuwiązkowej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA, *dual-energy X-ray absorptiometry*), i metabolizmem kostnym ocenianym na podstawie oznaczeń osteokalcyny (OC, *osteocalcin*) w surowicy krwi oraz C-końcowego usieciowanego telopeptydu łańcucha α1 kolagenu typu I (CTx, *C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen*); 2) ustalenie, czy OPG i jej ligand RANKL mogą mieć znaczenie w mechanizmie tych zależności.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 20 otyłych kobiet w wieku pomenopauzalnym hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii Katedry Patofizjologii i Endokrynologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, u których po wykluczeniu choroby Cushinga i innych endokrynopatii została rozpoznana otyłość prosta. Do badań włączono chore, u których po wykonaniu wstępnych badań biochemicznych nie stwierdzono takich zaburzeń, jak insulinooporność, nieprawidłowy profil lipidowy czy nieprawidłowa krzywa glikemiczna. Z badań wykluczono pacjentki, u których po wykonaniu badań klinicznych i/lub biochemicznych stwierdzono: niewydolność wątroby i nerek, chorobę wieńcową, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, choroby układu tkanki łącznej, choroby nowotworowe, choroby autoimmunologiczne, a także pacjentki przyjmujące hormony tarczycy i kortykosteroidy (m.in. terapię estrogenowo-progestageną) oraz niesteroidowe leki prze-

ciwzapalne. Do badań nie zostały również włączone kobiety leczone preparatami antyresorpcyjnymi oraz lekami immunosupresyjnymi. Badaniami objęto kobiety, u których otyłość rozpoczęła się w wieku dojrzałym. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych ochotniczek z prawidłową masą ciała w porównywalnym wieku.

Wszystkim kobietom uczestniczącym w badaniach godzinę przed ich rozpoczęciem zakładano wenflon do żyły łokciowej. Krew pobierano w odstępach 3-godzinnych w ciągu doby (począwszy od godz. 8.00) w ilości 5 ml, a uzyskaną po odwirowaniu krwi surowicę zamrażano i przechowywano w temperaturze -75 °C do czasu oznaczenia stężeń DHEA, OC, CTx, OPG i jej rozpuszczalnego liganda sRANKL metodą ELISA. W próbkach krwi pobranych o godzinie 8.00 oznaczono także stężenie folitropiny (FSH, *follicle-stimulating hormone*) i 17β-estradiolu (E<sub>2</sub>) metodą radioimmunologiczną (RIA). U wszystkich kobiet wykonano również badanie BMD metodą DXA obejmujące część lędźwiową kręgosłupa L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> na aparacie Lunar DPX (Stany Zjednoczone).

Wyniki badań densytometrycznych oraz wyniki oznaczenia stężeń DHEA, OC, CTx, OPG i sRANKL w surowicy poddano rutynowej ocenie statystycznej, przyjmując za różnicę istotną statystycznie wartość p mniejszą lub równą 0,05. Ocenę rytmu dobowego przeprowadzono metodą kosinorową według Halberga i wsp. [23].

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach (NN-013-24/I/03/04).

## Wyniki

W tabeli 1 zestawiono dane kliniczne i antropometryczne charakteryzujące grupę otyłych kobiet oraz kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała. Stwierdzono istotne różnice w masie ciała, wartościach BMI i WHR między grupą kobiet otyłych a grupą kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała.

Wyniki badań densytometrycznych (DXA) obejmujących część lędźwiową kręgosłupa L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> u otyłych i zdrowych kobiet po menopauzie przedstawiono w tabeli 2. Wykazano znamienne różnice w BMD badanych kręgow między grupą otyłych kobiet a grupą kontrolną, zarówno w odniesieniu do BMD wyrażonej w g/cm<sup>2</sup> (1,173 g/cm<sup>2</sup> v. 1,047 g/cm<sup>2</sup>), jak i w postaci wskaźników Z-score (0,47 v. -0,71) i T-score (0,01 v. -1,28).

Na rycinach 1 i 2 przedstawiono wyniki oznaczenia stężeń OC i CTx w surowicy podczas doby u otyłych kobiet po menopauzie i w grupie kontrolnej. Zarówno u kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała, jak i ko-

**Tabela 1. Podstawowe dane kliniczne i antropometryczne charakteryzujące grupy otyłych i zdrowych kobiet po menopauzie. Podano zakres wartości oraz wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe**

Zmienne	Grupy	
	Kobiety zdrowe (n = 15)	Kobiety otyłe (n = 20)
Wiek (lata)	53–61	53–70
	56,8 $\pm$ 2,8	58,7 $\pm$ 5,2
Wzrost [m]	1,55–1,68	1,52–1,64
	1,62 $\pm$ 0,09	1,59 $\pm$ 0,06
Masa ciała [kg]	57,00–73,20	86–110,70
	65,10 $\pm$ 11,46	96,09 $\pm$ 8,59 <sup>a</sup>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23,75–25,96	35,95–40,80
	24,86 $\pm$ 1,56	37,94 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>
WHR	0,69–0,89	0,80–0,94
	0,79 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Ostatnia miesiączka (lata)	44–50	49–56
	49,75 $\pm$ 2,82	52,39 $\pm$ 1,94
Okres po fizjologicznej menopauzie (lata)	4–10	3–9
	6,50 $\pm$ 4,95	6,00 $\pm$ 4,24
Czas trwania otyłości (lata)	–	12–19
		15,50 $\pm$ 4,95

<sup>a</sup>p  $\leq$  0,05 w porównaniu z grupą kontrolną; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; WHR (*waist-to-hip ratio*) — wskaźnik talia–biodra

**Tabela 2. Gęstość mineralna kości części lędźwiowej kręgosłupa L<sub>2</sub>–L<sub>4</sub> (wyrażona w g/cm<sup>2</sup>  $\pm$  odchylenie standardowe oraz jako Z-score i T-score) u kobiet po menopauzie otyłych i zdrowych (grupa kontrolna). Podano zakres wartości oraz wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe**

Zmienne	Grupy	
	Kobiety zdrowe (n = 15)	Kobiety otyłe (n = 20)
BMD [g/cm <sup>2</sup> ]	0,955–1,160	0,919–1,401
	1,047 $\pm$ 0,078	1,173 $\pm$ 0,157 <sup>a</sup>
Z-score	–1,13–0,43	–1,57–1,75
	–0,71 $\pm$ 0,65	0,47 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>
T-score	–2,04–0,33	–1,06–1,68
	–1,28 $\pm$ 0,66	0,01 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p  $\leq$  0,05 w porównaniu z grupą kontrolną; T-score — liczba odchyłeń standardowych względem szczytowej BMD; Z-score — liczba odchyłeń standardowych względem normy dla wieku i płci; BMD (*bone mineral density*) — gęstość mineralna kości

biety otyłych stwierdzono znamienne rytmy dobowe stężeń OC w surowicy. U otyłych kobiet wykazano istotne obniżenie średniego dobowego stężenia OC

w surowicy (5,34  $\mu$ mol/l v. 5,75  $\mu$ mol/l) i amplitudy rytmu (0,10  $\mu$ mol/l v. 0,18  $\mu$ mol/l) w stosunku do grupy kontrolnej, bez zmian akrofazy rytmu (2.13 v. 4.20). Znamienne zmniejszenie średnich stężeń OC u kobiet otyłych obserwowano o godzinie 8.00 oraz w godzinach 23.00–5.00.

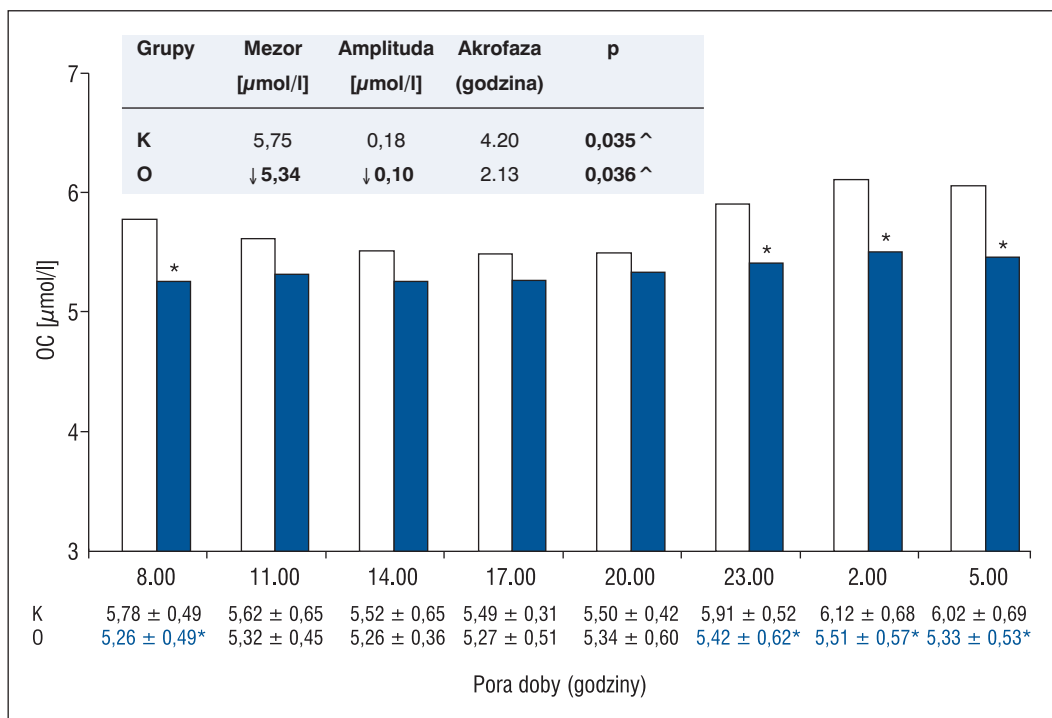
Kosinorowa analiza stężeń CTx podczas doby wykazała istnienie rytmu dobowego u zdrowych kobiet z prawidłową masą ciała i otyłych kobiet po menopauzie. Wartości akrofazy rytmów przypadają odpowiednio na godzinę 2.21 i 3.22. Stwierdzono istotne obniżenie średniego dobowego stężenia CTx w surowicy u otyłych kobiet w porównaniu z kobietami szczupłymi (3,15 nmol/l v. 5,31 nmol/l). Wykazano również zaburzenie rytmu dobowego CTx w postaci znacznego obniżenia wartości amplitudy (0,75 nmol/l v. 1,90 nmol/l). Średnie stężenia CTx u otyłych chorych były znacznie obniżone w godzinach 11.00–5.00.

Ryciny 3 i 4 obrazują okołodobowe oscylacje stężeń OPG i sRANKL w badanych grupach kobiet.

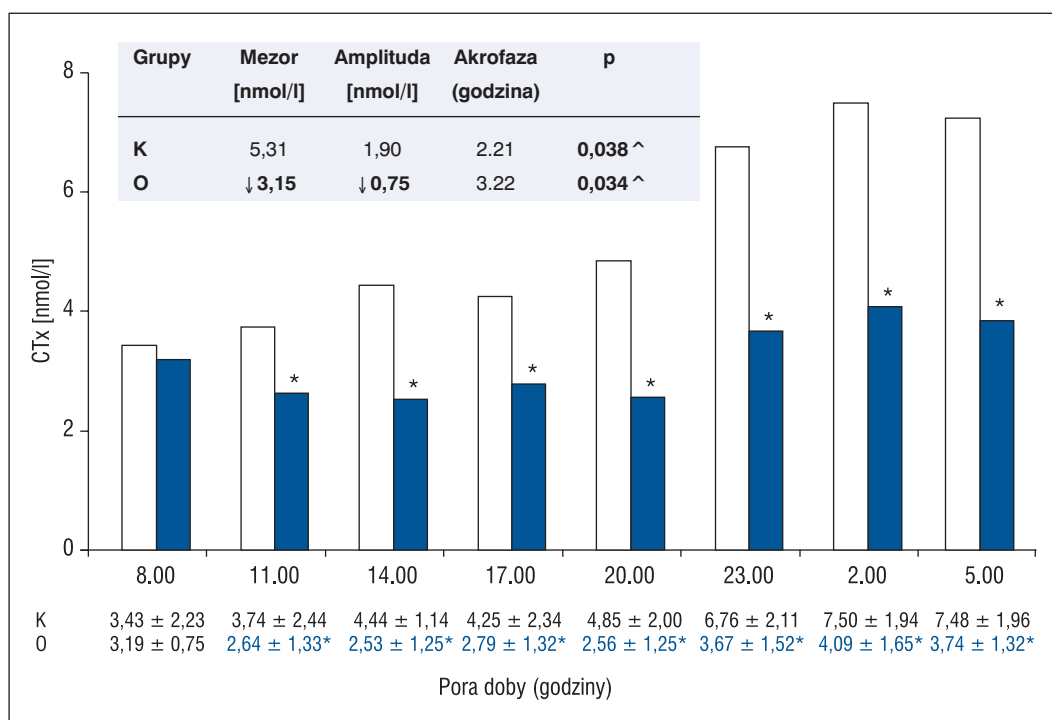
Zarówno u kobiet otyłych w wieku pomenopauzalnym, jak i w grupie kontrolnej wykazano istnienie rytmu dobowego OPG z akrofazą przypadającą odpowiednio na godzinę 9.29 i 8.56. U otyłych kobiet średnie dobowe stężenie OPG było znacznie obniżone w porównaniu z grupą kontrolną (3,26 pmol/l v. 4,06 pmol/l). Stwierdzono ponadto znaczne obniżenie wartości amplitudy okołodobowych oscylacji (0,44 pmol/l v. 0,59 pmol/l). Istotne obniżenie średnich stężeń OPG u otyłych kobiet stwierdzono o godzinach: 8.00, 11.00, 17.00, 20.00, 2.00 i 5.00.

Analiza stężeń sRANKL podczas doby metodą kosinorową wykazała istnienie rytmu dobowego w obydwu badanych grupach kobiet. Zaobserwowano znamienne obniżenie wartości średniodobowych stężeń sRANKL (0,54 pmol/l v. 0,66 pmol/l) oraz amplitudy okołodobowych oscylacji tej cytokiny (0,15 pmol/l v. 0,26 pmol/l) w stosunku do grupy kontrolnej. Stwierdzono również przesunięcie akrofazy rytmu sRANKL na godzinę późniejszą (9.08 v. 6.23). Średnie stężenia sRANKL były istotnie obniżone u otyłych kobiet o godzinach 8.00, 2.00 i 5.00.

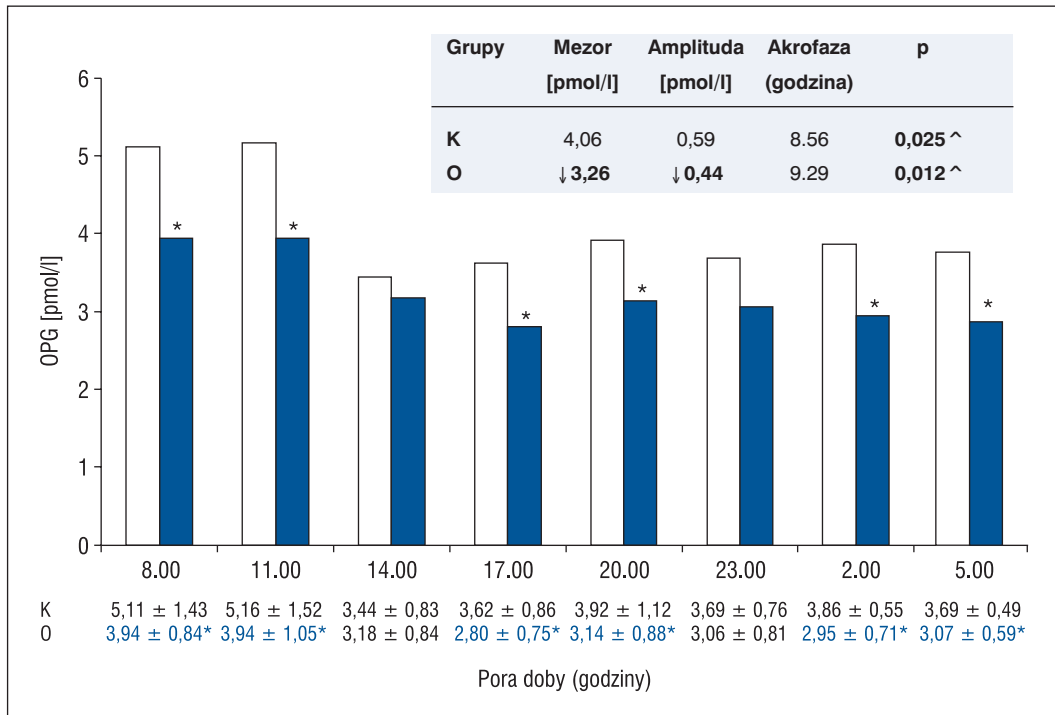
Na rycinie 5 przedstawiono okołodobowe fluktuacje stężeń DHEA w surowicy u otyłych kobiet po menopauzie i w grupie kontrolnej. W obydwu grupach badanych kobiet nie wykazano znamiennego rytmu okołodobowego stężeń DHEA w surowicy. Średniodobowe stężenia DHEAS u otyłych kobiet po menopauzie były istotnie zwiększone w porównaniu z kobietami szczupłymi (5,14 ng/ml v. 3,46 ng/ml). Stwierdzono także wzrost amplitudy okołodobowych oscylacji stężeń tego hormonu (1,25 ng/ml v. 0,64 ng/ml).



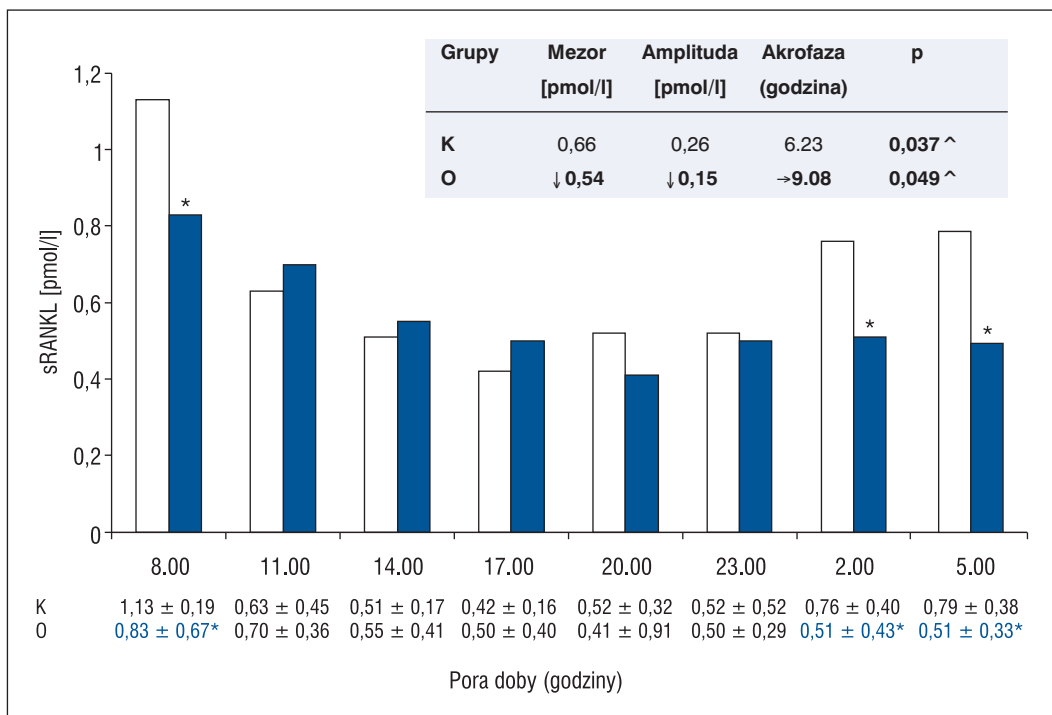
**Rycina 1.** Okołodobowe oscylacje średnich stężeń osteokalcyny (OC;  $\mu\text{mol/l}$  ± odchylenie standardowe) w surowicy oraz parametry chronobiologiczne rytmu dobowego u otyłych (O) i zdrowych (grupa kontrolna — K) kobiet po menopauzie; ^  $p \leq 0,05$  — znamieny rytm dobowy; \*  $p \leq 0,05$  — znamienna różnica w porównaniu z grupą kontrolną



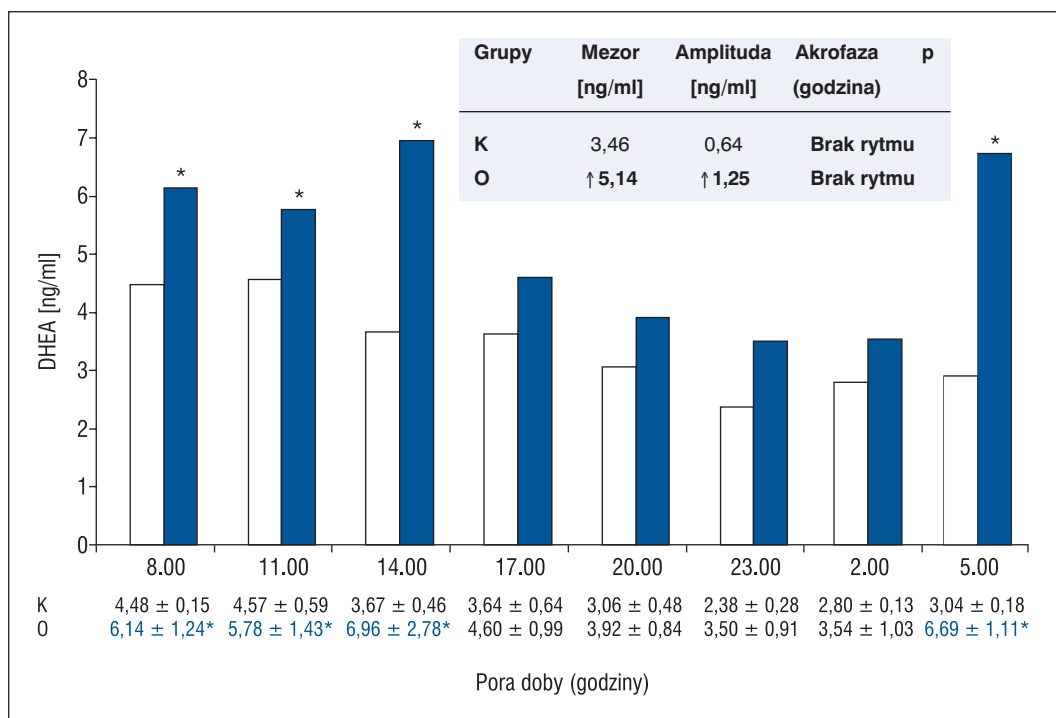
**Rycina 2.** Okołodobowe oscylacje średnich stężeń C-terminalnego usieciowanego telopeptydu łańcucha  $\alpha 1$  kolagenu typu I (CTx; nmol/l ± odchylenie standardowe) w surowicy oraz parametry chronobiologiczne rytmu dobowego u otyłych (O) i zdrowych (grupa kontrolna — K) kobiet po menopauzie; ^  $p \leq 0,05$  — znamieny rytm dobowy; \*  $p \leq 0,05$  — znamienna różnica w porównaniu z grupą kontrolną



**Rycina 3.** Okołodobowe oscylacje średnich stężeń osteoprotegeryny (OPG; pmol/l ± odchylenie standardowe) w surowicy oraz parametry chronobiologiczne rytmu dobowego u otyłych (O) i zdrowych (grupa kontrolna — K) kobiet po menopauzie; ^ p ≤ 0,05 — znamieny rytm dobowy; \*p ≤ 0,05 — znamienna różnica w porównaniu z grupą kontrolną



**Rycina 4.** Okołodobowe oscylacje średnich stężeń rozpuszczalnego liganda receptora aktywatora czynnika jądrowego κB (sRANKL; pmol/l ± odchylenie standardowe) w surowicy oraz parametry chronobiologiczne rytmu dobowego u otyłych (O) i zdrowych (grupa kontrolna — K) kobiet po menopauzie; ^ p ≤ 0,05 — znamieny rytm dobowy; \*p ≤ 0,05 — znamienna różnica w porównaniu z grupą kontrolną



**Rycina 5.** Okołodobowe oscylacje średnich stężeń dehydroepiandrosteronu (DHEA; ng/ml ± odchylenie standardowe) w surowicy oraz parametry chronobiologiczne rytmu dobowego u otyłych (O) i zdrowych (grupa kontrolna — K) kobiet po menopauzie; \* $p \leq 0,05$  — znamienne różnica w porównaniu z grupą kontrolną

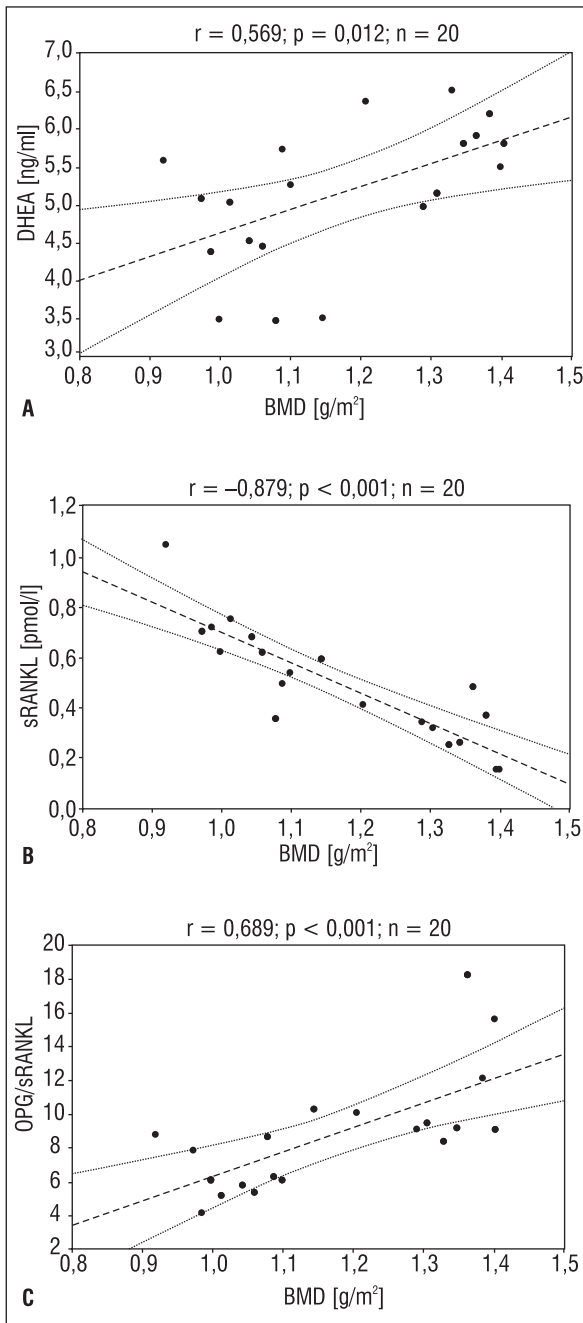
Na rycinach 6–8 przedstawiono wzajemne korelacje między badanymi czynnikami u otyłych kobiet po menopauzie. Wykazano znamienne dodatnią korelację między wartościami BMD a średnimi dobowymi stężeniami DHEA ( $r = 0,569$ ;  $p = 0,012$ ; ryc. 6.A) i wartościami wskaźnika OPG/sRANKL ( $r = 0,689$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 6.C) oraz ujemną korelację ze średnimi dobowymi stężeniami sRANKL ( $r = -0,879$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 6.B). Okołodobowe stężenia DHEA korelowały ujemnie znamienne statystycznie z okołodobowymi stężeniami OC ( $r = -0,311$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 7.A), CTx ( $r = -0,319$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 7.B) i sRANKL ( $r = -0,490$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 7.D), a dodatnio z OPG ( $r = 0,437$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 7.C) i wskaźnikiem OPG/sRANKL ( $r = 0,469$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 8.A). Wykazano również istotną ujemną korelację między okołodobowymi stężeniami OC i sRANKL ( $r = -0,399$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 8.B) oraz między okołodobowymi stężeniami OPG i sRANKL ( $p = -0,357$ ;  $p < 0,001$ ; ryc. 8.C).

## Dyskusja

Zarówno otyłość, jak i osteoporoza są chorobami cywilizacyjnymi, które mogą prowadzić do inwalidztwa, a nawet zgonu [12–14]. Jednak wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że oba te schorzenia należy rozpa-

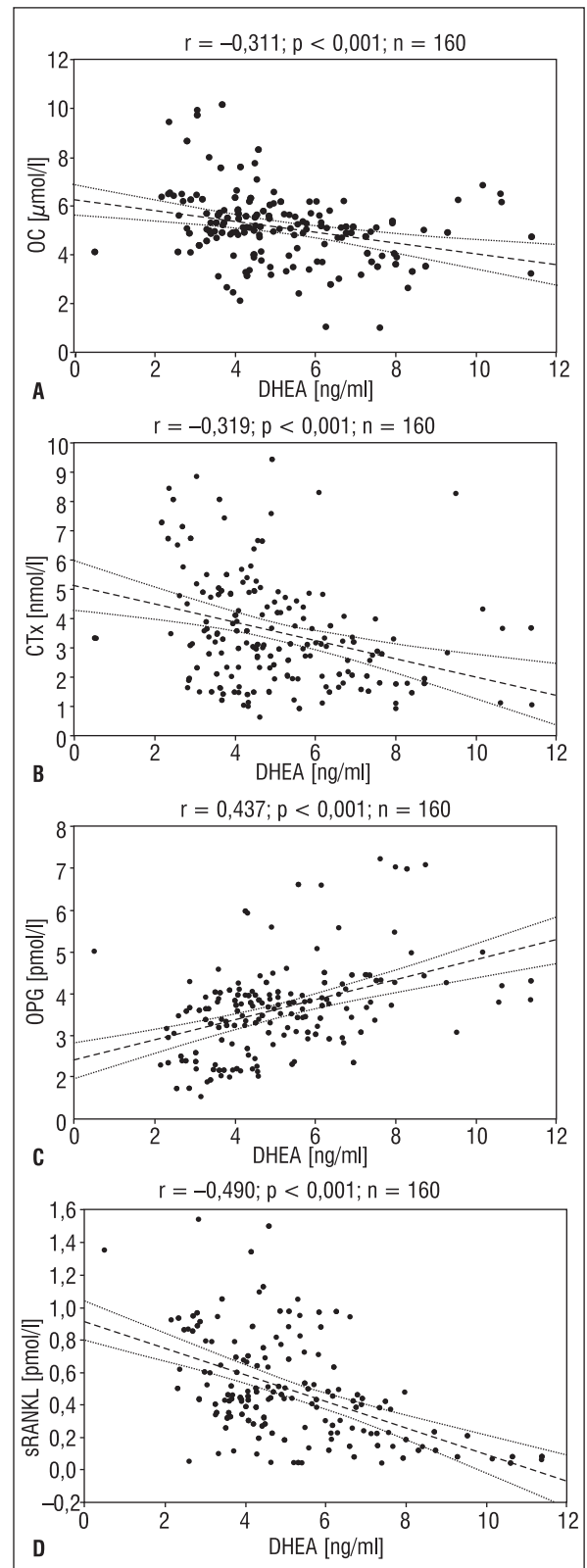
trywać nie tylko w takim niekorzystnym aspekcie. Okazuje się, że otyłość nie jest czynnikiem ryzyka osteoporozy [2, 11–16]. Dowiedzono, że kobiety po menopauzie z co najmniej 30-procentową nadwagą charakteryzują się wyższą BMD mierzoną w zakresie kręgosłupa lędźwiowego L<sub>2</sub>–L<sub>4</sub> (co potwierdziły także wyniki aktualnych badań autorów niniejszej pracy), bliższej nasady kości udowej oraz kości promieniowej niż szczupłe kobiety po menopauzie [2, 12–14, 24–26]. Wykazano ponadto znamienne dodatnią korelację między BMI a BMD mierzoną w zakresie części lędźwiowej kręgosłupa i bliższej nasady kości udowej [2, 12–14, 27]. Wyniki niektórych badań wskazują, że u otyłych kobiet wraz z zaawansowaniem procesu menopauzy BMD obniża się najszybciej w zakresie kości promieniowej [2]. Jednak inni autorzy nie wykazali zależności między wartościami BMD kości przedramienia u kobiet w wieku pomenopauzalnym a stopniem otyłości [14].

Niewielu autorów oceniało obrót metaboliczny tkanki kostnej u otyłych kobiet w aspekcie chronobiologicznym. Większość prac badawczych z tego zakresu, zwłaszcza prowadzonych w latach 80. ubiegłego wieku, opierała się na jednorazowych oznaczeniach (zazwyczaj na czczo) markerów kościotworzenia (fosfatazy alkalicznej [ALP, *alkaline phosphatase*], OC i karboksyterminalnego propeptydu prokolagenu typu I



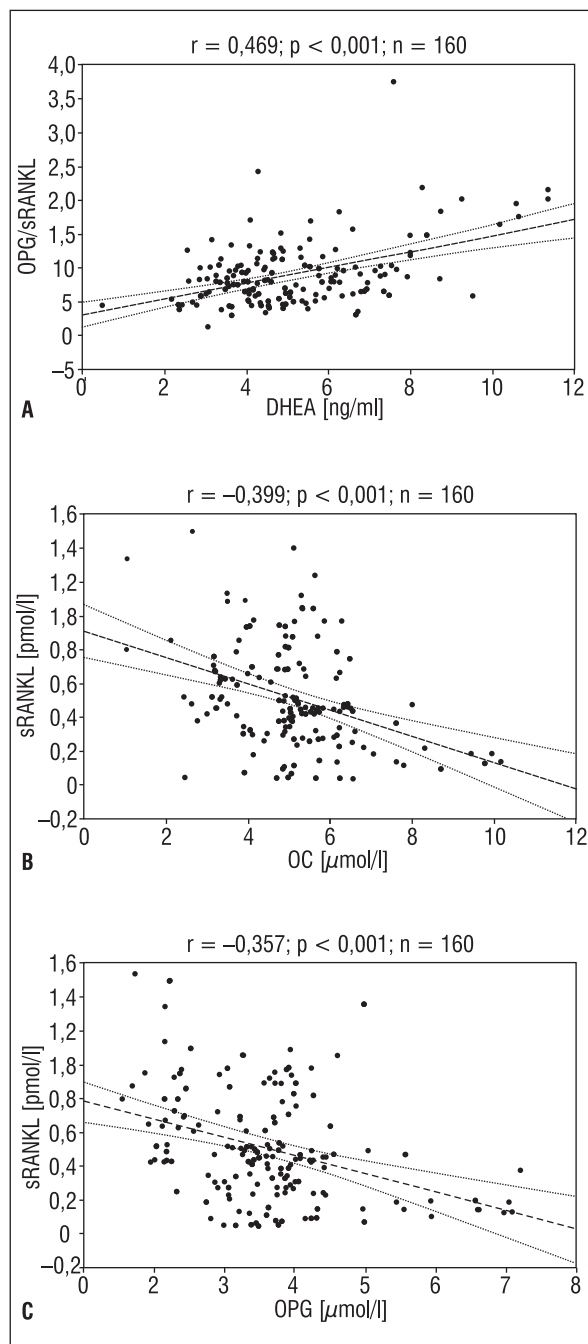
**Rycina 6.** Ocena korelacji między gęstością mineralną kości (BMD) wyrażoną w g/cm<sup>2</sup> a średnimi dobowymi wartościami: **A.** Dehydroepiandrosteronu (DHEA); **B.** Rozpuszczalnego liganda receptora aktywatora czynnika jądrowego  $\kappa$ B (sRANKL); **C.** wskaźnika osteoprotegeryna (OPG)/sRANKL u otyłych kobiet po menopauzie

w surowicy lub osoczu) i resorpcji kości (wapnia całkowitego, hydroksyproliny lub pirydynoliny i dezoksyhiprydynoliny w moczu porannym lub dobowym) [24, 25, 28–30]. Wyniki tych badań sugerują, że u otyłych kobiet występuje najprawdopodobniej zwiększenie kościotworzenia i ograniczenie resorpcji kości albo oba te procesy równocześnie. Stwierdzono istotną ujemną



**Rycina 7.** Ocena korelacji między okołodobowymi stężeniami dehydroepiandrosteronu (DHEA) a okołodobowymi stężeniami: **A.** Osteokalcyny (OC); **B.** C-terminalnego usieciowanego telopeptydu łańcucha  $\alpha$ 1 kolagenu typu I (CTX); **C.** Osteoprotegeryny (OPG), **D.** Rozpuszczalnego liganda receptora aktywatora czynnika jądrowego  $\kappa$ B (sRANKL) u otyłych kobiet po menopauzie





**Rycina 8.** Ocena korelacji między okołodobowymi stężeniami: **A.** Dehydroepiandrosteronu (DHEA) a wartościami wskaźnika osteoprotegeryna (OPG)/rozpuszczalny ligand receptora aktywatora czynnika jądrowego  $\kappa\text{B}$  (sRANKL); **B.** Osteokalcyny (OC) a sRANKL; **C.** OPG a sRANKL u otyłych kobiet po menopauzie

korelację między porannym wydalaniem wapnia a masą ciała i/lub BMI. Obserwowano także korelujące ze wzrostem ilości tkanki tłuszczowej obniżenie resorpcji kości, bez towarzyszącego zmniejszenia kościotworzenia [30]. Zastosowanie monoklonalnych przeciwciał alkalicznej fosfatazy kostnej, modyfikacja oznaczeń OC, a także wprowadzenie oznaczeń produktów usieciowania kolagenu, nie tylko w moczu, ale i w surowicy

krwi, znacznie zwiększyły czułość i specyficzność tych oznaczeń oraz wyeliminowały konieczność odnoszenia uzyskanych wyników do stężenia kreatyniny (co jest niezbędne w przypadku oznaczeń w moczu). Toteż badania z wykorzystaniem par tych tak zwanych nowoczesnych, swoistych markerów kostnych (OC i CTx lub N-końcowego usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I [NTx, *N-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen*], frakcji kostnej ALP i CTx lub NTx oraz aminoterminalnego propeptydu prokolagenu typu I i CTx lub NTx) pozwoliły na bardziej miarodajną ocenę tempa obrotu kostnego u otyłych kobiet. Wyniki tych badań wskazują, że wraz ze wzrostem stopnia otyłości (niezależnie od rozmieszczenia tkanki tłuszczowej) występuje raczej tendencja do supresji (a nie do pobudzenia, jak sądzono w latach 80. ubiegłego wieku) tworzenia tkanki kostnej, a także do zmniejszenia resorpcji kości [2, 9–12, 22, 31]. Podobne wyniki uzyskali autorzy niniejszej pracy, prowadząc badania u otyłych kobiet po menopauzie w aspekcie chronobiologicznym. Wykazano supresję zarówno procesu kościotworzenia, jak i resorpcji kości, z jednoczesnym zachwianiem równowagi między tymi procesami. Zaobserwowane zmiany w przebudowie kości mogą być związane z często występującymi u otyłych kobiet po menopauzie zaburzeniami w wytwarzaniu niektórych czynników osteotropowych, głównie hormonów, takich jak estrogeny, hormony kalciotropowe, leptyna czy melatonina [2, 9, 10, 15, 32, 33], a także ze zmianami we wzajemnej relacji hormon wzrostu (GH, *growth hormone*)/IGF-I [2, 22] oraz w produkcji cytokin, w tym głównie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , czynnika stymulującego kolonie makrofagów (M-CSF, *macrophage-colony stimulating factor*) oraz TGF- $\beta$ , działających na poziomie szkieletu poprzez osteoblasty, komórki macierzy kostnej i inne komórki tkanki kostnej [6]. Ponieważ do oceny tempa obrotu kostnego autorzy pracy wybrali parę wysoce swoistych nowoczesnych markerów kostnych (OC, CTx), które oznaczono w surowicy krwi, można wnioskować, że u badanych otyłych kobiet dochodzi do zmniejszenia tempa obrotu metabolicznego tkanki kostnej i ujawniającego się w okresie późniejszym zwiększenia masy kostnej, czego odzwierciedleniem jest zaobserwowany wzrost BMD.

Nieliczni badacze oceniali powiązania między stanem kości a OPG i/lub RANKL u kobiet. Niektórzy z nich u zdrowych kobiet w różnym wieku nie stwierdzili zależności między OPG a markerami kostnymi [17–19] oraz markerami kostnymi i BMD [17, 19]. Inni [20] w grupie osób obu płci w wieku 30–85 lat wykazali związek między OPG a markerami kościotworzenia, przy braku zależności między OPG a BMD. Ponadto w badanej grupie kobiet cytowani autorzy stwierdzili ujemną

korelację między OPG a winianooporną fosfatazą kwaśną. Wyniki prowadzonych wcześniej przez autorów niniejszej pracy badań u kobiet po menopauzie z prawidłową masą ciała [21] wskazały na istnienie znamiennej ujemnej korelacji między BMD a sRANKL (przy braku zależności między BMI a OPG) oraz dodatniej korelacji ze wskaźnikiem OPG/sRANKL. U kobiet po menopauzie z udokumentowaną osteoporozą stwierdzono istotne zmiany w powiązaniach między BMI, OPG, sRANKL i wskaźnikiem OPG/sRANKL. Znamiennej ujemnej korelacji wykazano nie tylko między BMD a sRANKL, ale także w odniesieniu do OPG, co najprawdopodobniej przyczyniło się do zniesienia zależności między BMD a wskaźnikiem OPG/sRANKL [21]. Natomiast Fahrleitner-Pammer i wsp. [18] u nieleczonych kobiet z udokumentowaną osteoporozą wykazali istnienie powiązań jedynie między OPG a OC i CTx. Na podstawie uzyskanej w niniejszych badaniach u otyłych kobiet po menopauzie ujemnej korelacji między BMD, OC, OPG a sRANKL i dodatniej korelacji między BMD a OPG/sRANKL można przypuszczać, że ujawniające się z wiekiem zmiany w okołodobowych stężeniach RANKL i w relacji OPG do RANKL w większym stopniu niż zmiany w stężeniach samej OPG modyfikują metabolizm kostny. Znajduje to odzwierciedlenie w zmianach BMD.

Ostatnio coraz częściej wskazuje się na możliwy udział ujawniającego się z wiekiem niedoboru androgenów (zwłaszcza nadnerczowych) w rozwoju osteoporozy po menopauzie [2–4, 34, 35]. Wykazano, że stężenie DHEA i jego siarczanu — DHEAS (uznanego markera czynności androgennej nadnerczy) zmniejsza się z wiekiem i że zmiany te korelują z BMD, tempem obrotu kostnego, jak również ze stężeniami IGF-I oraz IL-6 [3, 34]. U otyłych kobiet w wieku pomenopauzalnym jest przeciwnie — wraz ze wzrostem stopnia otyłości na ogół obserwuje się korelującą z DHEA tendencję do zmniejszania się tempa obrotu kostnego i wzrostu BMD [1–3]. Na tej podstawie można sądzić, że towarzyszące otyłości zmiany w stężeniach DHEA mogą działać protekcyjnie na tkankę kostną. We wcześniejszych badaniach autorzy niniejszej pracy wykazali zależność między masą ciała i BMI a okołodobowymi stężeniami DHEAS, IGF-I, IL-6 i obrotem kostnym u otyłych kobiet po menopauzie [1]. Wyniki

tych badań wydają się potwierdzać koncepcję, że wpływ DHEA może być realizowany poprzez anaboliczny (pobudzenie wytwarzania IGF-I) i/lub antyosteolityczny mechanizm (hamowanie wytwarzania IL-6) [1]. W oddziaływaniu tym istotną rolę mogłyby odgrywać OPG i RANKL [2], na co wskazują zaobserwowane u otyłych kobiet po menopauzie, korelujące z BMD, zmiany w chronogramach DHEA, markerów kostnych i/lub OPG i sRANKL. Na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych badaniach [1] oraz wyników przedstawionych w niniejszej pracy można przypuszczać, że zwiększone u otyłych kobiet po menopauzie wydzielanie DHEA mogłoby bezpośrednio wpływać na ekspresję OPG i/lub RANKL w osteoblastach i/lub pośrednio modyfikować relację OPG/RANKL, działając hamująco na wytwarzanie IL-6 oraz pobudzająco na wytwarzanie IGF-I. Wiadomo, że czynniki te mogą modulować ekspresję OPG i/lub RANKL, pełniąc funkcję pośrednich mediatorów [6]. Niektóre z nich są także wydzielane przez tkankę tłuszczową [6, 12–14]. Wyniki badań *in vitro* z użyciem izolowanych osteoblastów myszy wskazujące, że DHEA w stężeniu co najmniej 0,01  $\mu\text{M}$ , zwłaszcza w zakresie stężeń 0,1–1  $\mu\text{M}$ , zwiększa nie tylko zdolność przeżycia osteoblastów, ale także powoduje przesunięcie na rzecz OPG relacji OPG/RANKL w tych komórkach [5], potwierdzają powyższą koncepcję. Badania przeprowadzone na hodowlach izolowanych osteoklastów (z udziałem izolowanych osteoblastów i bez ich obecności) dowodzą, że DHEA hamuje osteoklastyczną resorpcję kości wyłącznie w obecności osteoblastów [5], co pośrednio wskazuje na udział układu OPG/RANKL w tym mechanizmie.

## Wnioski

1. Otyłość u kobiet po menopauzie prowadzi do wzrostu okołodobowego wydzielania DHEA, któremu towarzyszy zwiększenie BMD, zmniejszenie metabolizmu kostnego oraz supresja okołodobowych oscylacji OPG i jej rozpuszczalnego liganda — sRANKL.
2. Zwiększone u otyłych kobiet w wieku pomenopauzalnym wydzielanie DHEA może korzystnie wpływać na tkankę kostną, najprawdopodobniej poprzez wpływ na relację OPG do RANKL.

## Piśmiennictwo

1. Ostrowska Z., Marek B., Kos-Kudła B. i wsp.: Okołodobowe oscylacje DHEAS, IGF-I i IL-6 a obrót kostny u otyłych kobiet w wieku pomenopauzalnym. Materiały Zjazdowe 2 Ogólnopolskiej Konferencji „Chirurgiczne leczenie otyłości. Aspekty podstawowe i kliniczne”, Zabrze–Wisła 15–17 października 2004: 32–33.
2. Ostrowska Z.: Menopause, obesity, and bone status. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2009; 63: 39–46.
3. Adachi M., Takayanagi R.: Role of androgens and DHEA in bone me-

- tabolism. *Clin. Calcium* 2006; 16: 61–66.
4. Szathmari M., Szucs J., Feher T., Hollo I.: Dehydroepiandrosterone sulphate and bone mineral density. *Osteoporosis Int.* 1994; 4: 84–88.
  5. Wang Y.D., Wang L., Li D.J., Wang W.J.: Dehydroepiandrosterone inhibited the bone resorption through the upregulation of OPG/RANKL. *Cell Mol. Immunol.* 2006; 3: 41–45.
  6. Hadjidakis D.J., Androulakis I.I.: Bone remodeling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1092: 385–396.
  7. Boyce B.F., Xing L.: The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2007; 5: 98–104.
  8. Vega D., Maalouf N.M., Sakhaee K.: The role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 4514–4521.
  9. Ostrowska Z., Kos-Kudła B., Świętochowska E. i wsp.: Przebudowa kości, system RANKL/RANK/OPG a melatonina. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2008; 62: 79–84.
  10. Ostrowska Z., Kos-Kudła B., Szapska B. i wsp.: Wpływ leptyny na tkankę kostną. *Endokrynol. Otył. Zab. Przem. Mat.* 2008; 4: 121–127.
  11. Cifuentes M., Johnson M.A., Lewis R.D. i wsp.: Bone turnover and body weight relationship differ in normal-weight compared with heavier postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 2003; 14: 116–122.
  12. Reid I.R.: Obesity and osteoporosis. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 2006; 67: 125–129.
  13. Rosen C.J., Bouxsein M.L.: Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006; 2: 35–43.
  14. Da Silva H.G., Mendonca L.M., Conceicao F.L., Zahar S.E., Farias M.L.: Influence of obesity on bone density in postmenopausal women. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2007; 51: 943–949.
  15. Holeccki M., Zahorska-Markiewicz B., Więcek A., Nieszporek T., Żak-Gołąb A.: Otyłość a metabolizm kości. *Endokrynol. Pol.* 2008; 59: 218–223.
  16. Takeda S.: Effect of obesity on bone metabolism. *Clin. Calcium* 2008; 18: 632–637.
  17. Khosla S., Arrighi H.M., Melton L.J. i wsp.: Correlation of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos. Int.* 2002; 13: 394–399.
  18. Fahrleitner-Pammer A., Dobing H., Piswanger-Soelkner C. i wsp.: Osteoprotegerin serum levels in women correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2003; 115: 291–297.
  19. Trofimov S., Pantsulaia I., Kobylansky E., Livshits G.: Circulating levels of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. *Eur. J. Endocrinol.* 2004; 150: 305–311.
  20. Indrisan O.S., Franzson L., Sigurdsson G.: Serum osteoprotegerin and relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos. Int.* 2005; 16: 417–423.
  21. Ostrowska Z., Kos-Kudła B., Głogowska-Szeląg J., Wołkowska-Pokrywa K., Szapska B.: Gęstość mineralna kości a okołodobowe oscylacje stężeń melatoniny, osteoprotegeryny i ligandu receptora aktywatora czynnika jądrowego kappa B u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną. XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Wisła 14–17 września 2010. *Diagn. Lab.* 2010; 46: 204.
  22. Ostrowska Z., Kobielski A., Kos-Kudła B., Marek B., Kajdaniuk D.: Otyłość a powiązania między osią somatotropinową a tkanką kostną. *Endokrynol. Pol.* 2009; 60: 302–309.
  23. Halberg F., Tong Y.L., Johnson E.A.: Circadian system phase as aspect of temporal morphology: procedure and illustrative examples. W: von Mayerbach H. (red.). *The cellular aspects of biorhythms.* Springer Verlag, Berlin 1967: 1–12.
  24. Nagant de Deuxchaines J.P., Devogelaer J.P.: Endocrinological states of postmenopausal osteoporosis. *Clin. Rheumatol. Dis.* 1986; 12: 559–635.
  25. Dawson-Hughes B., Shipp C., Sadowski L., Dallal G.: Bone density of the radius, spine and hip in relation to percent ideal body weight in postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 1987; 40: 310–314.
  26. Douchi T., Yamamoto S., Oki T. i wsp.: Difference in the effect of adiposity on bone density between pre- and postmenopausal women. *Maturitas* 2000; 34: 261–266.
  27. Ertungealp E., Seyisoglu H., Erel C.T., Senturk L.M., Gezer A.: Changes in bone mineral density with age, menopausal status and body mass index in Turkish women. *Climacteric* 1999; 2: 45–51.
  28. Frumar A.M., Meldrum D.R., Geola F. i wsp.: Relationship of fasting urinary calcium to circulating estrogen and body weight in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980; 50: 70–75.
  29. Ribot C., Tremollieres F., Pouilles J.M., Boneu M., Germain F., Louvet J.P.: Obesity and postmenopausal bone loss: the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. *Bone* 1988; 8: 327–331.
  30. Hassager C., Christiansen C.: Influence of soft-tissue body composition on bone mass and metabolism. *Bone* 1989; 10: 415–419.
  31. Papakitsou E.F., Margioris A.N., Dreidakis K.E. i wsp.: Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas* 2004; 47: 185–193.
  32. Pasquali R., Vicennati V.: Obesity and hormonal abnormalities. W: Björntrop P. (red.). *International textbook of obesity.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2001: 225–239.
  33. Perello M., Spinedi E.: Neuroendocrine aspects of obesity. *Medicina* 2004; 64: 257–264.
  34. Perrini S., Laviola L., Natalicchio A., Giorgino F.: Associated hormonal declines in aging: DHEAS. *J. Endocrinol. Invest.* 2005; 28: 85–93.
  35. Chahal H.S., Drake W.M.: The endocrine system and ageing. *J. Pathol.* 2007; 211: 173–180.