Odnos polimorfizma gena za vitamin-D receptor, alfa-1 lanac kolagena I i estrogeni receptor i koštane mase u bolesnika s hipertireozom

Jelčić, Jozo

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:453773

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Jelčić, Jozo (2008) ***Odnos polimorfizma gena za vitamin-D receptor, alfa-1 lanac kolagena I i estrogeni receptor i koštane mase u bolesnika s hipertireozom [The association of polymorphisms of the vitamin-D receptor gene, collagen type I alpha-1 gene and estrogen receptor gene and bone mineral density in patients with hyperthyroidism].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/560

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jozo Jelčić

Odnos polimorfizma gena za vitamin-D receptor, alfa-1 lanac kolagena I i estrogeni receptor i koštane mase u bolesnika s hipertireozom

DISERTACIJA

Zagreb, 2008.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jozo Jelčić

Odnos polimorfizma gena za vitamin-D receptor, alfa-1 lanac kolagena I i estrogeni receptor i koštane mase u bolesnika s hipertireozom

DISERTACIJA

Zagreb, 2008.

Ova disertacija je izrađena u okviru dva znanstvenoistraživačka projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH:

"Zajednička molekularna osnova etiopatogeneza koštanih poremećaja u ljudi" (214-1080229-0163) i
"Genetika i funkcija hematopoeze i mikrookoliša u Ph^- mijeloproliferacijama" (108-1980955-3094)

Ovaj rad izrađen je u:
Zavodu za endokrinologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb,
Klinici za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb,
Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava

Mentor: doc. dr.sc. Vesna Kušec

Zahvaljujem:

doc. dr. Vesni Kušec, na savjetima koji su mi bili od dragocjene pomoći pri pisanju disertacije
doc. dr. Rajku Kušecu, na nesebičnom trudu uloženom u izvođenje laboratorijskih analiza
dr. sc. Ozrenu Polašeku na dragocjenoj pomoći pri rješavanju statističkih problema

Posveta:

Ovu disertaciju posvećujem svojim najdražima, supruzi Dini i kćeri Katarini, čija ljubav, potpora i nježnost su mi dali snagu da ustrajem.

SADRŽAJ **Stranica**

1. UVOD 7

1.1. Definicija osteoporoze 11

1.2. Epidemiologija osteoporoze 14

1.3. Etiologija osteoporoze 17

1.4. Podjela osteoporoze 20

1.5. Patofiziologija osteoporoze 22

1.5.1. Struktura kosti 22

1.5.2. Koštana pregradnja 25

1.6. Hipertireoza i kost 28

1.6.1. Kinetičke studije metabolizma kalcija 32

1.6.2. Hiperitreoza i koštana pregradnja 33

1.6.3. Hipertireoza, koštana masa i lomljivost kosti 34

1.7. Tjelesna masa, struktura tijela i kost 36

1.7.1. Utjecaj indeksa tjelesne mase na BMD u bolesnica s hipertireozom 36

1.7.2. Utjecaj strukture tijela na BMD 37

1.7.3. Povezanost tjelesne mase i strukture tijela s prijelomima 37

1.7.4. Genetska osnova povezanosti tjelesne mase i BMD-a 38

1.7.5. „Mršava“ tjelesna masa i BMD 39

1.7.6. Masno tkivo i BMD 40

1.8. Genetika osteoporoze 42

1.8.1. Meta-analize polimorfizama VDR gena i BMD-a 52

1.8.2. Meta-analize polimorfizama COL1A1 gena i BMD-a 53

1.8.3. Meta-analize polimorfizama ERα i BMD-a 54

1.8.4. Spoznaje o odnosu polimorfizama gena za VDR, COL1AI i ERα proistekle iz rezultata pojedinačnih studija i meta-analiza 54

1.8.5. Genetika osteoporoze u premenopauzalnih žena 55

1.8.6. Genetika osteoporoze u muškaraca 56

1.8.7. Polimorfizmi TaqI VDR, PluII ERα i Sp1 COL1AI i BMD . 57

1.8.7.1. Polimorfizmi TaqI VDR, PvuII ERα i Sp1 COL1AI i BMD u premenopauzalnih eutireoidnih žena 58

1.8.7.2. Polimorfizmi TaqI VDR, PluII ERα i Sp1 COL1AI i BMD u postmenopauzalnih eutireoidnih žena 59
1.8.8. Genetika sekundarne osteoporoze 60
1.8.9. Genetika sekundarne osteoporoze uzrokovane hipertireozom 60
1.9. Polimorfizmi gena za VDR i ER i Basedowljeva bolest i Hashimotov tireoiditis 63
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 64
3. ISPITANICI 65
4. METODE 66
4.1. Denzitometrija 66
4.2. Genetske analize 68
5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 80
6. REZULTATI 81
6.1. Rezultati ispitivanja genotipova 81
6.2. Rezultati mjerenja gustoće kosti 83
6.3. Rezultati povezanosti ispitivanih genotipova, parametara koštane i tjelesne mase 84
6.4. Rezultati analize odnosa ostalih parametara 93
7. RASPRAVA 95
8. ZAKLJUČCI 100
9. SAŽETAK 101
10. SUMMARY 102
11. LITERATURA 103
12. POPIS KRATICA 145
13. ŽIVOTOPIS 146
14. PRILOG: SUGLASNOST ISPITANIKA ZA SUDJELOVANJE U ISPITIVANJU..... 147
SUGLASNOST ETIČKOG POVJERENSTVA

1. UVOD

Osteoporoza je jedan od najvećih javno-zdravstvenih problema današnjeg razvijenog svijeta i zemalja u razvoju. Porast standarda i napredak medicine u dvadesetom stoljeću uzrokovali su značajno produženje očekivanog trajanja života, s 50 godina koliko je iznosio početkom 20. stoljeća na preko 80 godina krajem stoljeća. S produženjem života povezan je i značajan porast učestalosti bolesti tipičnih za postmenopauzalnu i kasniju životnu dob, među kojima je i osteoporoza. Najčešći uzrok osteoporoze danas je postmenopauzalni deficit estrogena. Osim postmenopauzalne, postoji niz drugih oblika osteoporoze. Osteoporoza se može javiti u bilo koje životno doba, ali dominantno se javlja u žena starijih od 60 godina. Javlja se u osoba oba spola i u svim dobnim skupinama. Muškarci predstavljaju 1/5-1/4 svih bolesnika s osteoporozom. Osteoporoza je multifaktorijalna i poligenetska bolest. Brojni su čimbenici rizika koji se mogu podijeliti na genetske i negenetske.

Čimbenicima iz okoliša, odnosno negenetskim čimbenicima, nije moguće objasniti veći dio gubitka koštane mase u perimenopauzalnih žena (1,2,3,4,5). Međutim, do sada nije sa sigurnošću potvrđena uloga genetskih čimbenika u gubitku koštane mase (6,7,8,9,10,11). Osteoporoza je poligenetska bolest s velikim brojem gena i njihovih polimorfizama uključenih u izgradnju i razgradnju kosti, organizaciju strukture koštanog tkiva i formiranje oblika i volumena kosti, preko kojih utječu na rizik nastanka osteoporoze i osteoporotičnih prijeloma, zbog čega je utjecaj jednog gena, odnosno jednog genskog polimorfizma mali i često teško detektabilan.

Studije na blizancima unatrag 30-tak godina pokazale su značajan utjecaj genetskih čimbenika na koštanu masu (4,12,13,14,15). Na genetsku podlogu osteoporoze ukazale su i obiteljske studije, te studije povezanosti BMD-a (engl. bone mineral density = mineralna gustoća kosti) i kromosomskih regija („linkage“ studije) na životinjama i ljudima, kao i identifikacija pojedinih gena čije mutacije uzrokuju neke monogenetske bolesti (kao što je osteoporoza-pseudoglioma sindrom) karakterizirane malom koštanom masom ili povećanom lomljivošću (16,17,18,19,20,21,22,23,24). „Linkage“ studije pokazale su povezanost genetskih čimbenika i parametara odgovornih za osteoporotične prijelome (25,26,27). Više puta učinjeno je i pretraživanje genoma u cilju pronalaženja kromosomskih regija i lokusa koji su povezani s BMD-om s nekonzistentnim rezultatima. Ioannidis i sur. u meta-analazi u koju je uključeno 9 linkage studija (studije povezanosti koštane mase i kromosomskih regija) sa širokim genomskim pretraživanjem i velikim brojem ispitanika (11.842), nisu potvrdili povezanost kromosomskih regija i koštane mase (28). Do sada još nije nađen gen koji

značajno utječe na koštanu masu. Razlozi leže u velikom broju gena koji utječu na koštanu masu, slabom utjecaju svakog od gena na BMD, moguće i regionalnim razlikama u distribuciji različitih gena u populaciji i njihovom utjecaju na BMD i velikoj genuinoj heterogenosti utjecaja genskih polimorfizama na koštanu masu. Osim toga, dosadašnje studije su pokazale da na BMD različitih dijelova skeleta utječu različiti geni čiji je utjecaj pri tome povezan još i s dobi i spolom (22,29,30). Geni koji reguliraju vršnu koštanu masu razlikuju se od gena koji utječu na BMD u starijih osoba (31). I na kraju, na lomljivost kosti osim BMD-a utječu i brojni drugi čimbenici, među kojima su struktura i oblik kosti, a na pojedina obilježja kosti kao što su dužina vrata bedrene kosti, debljinu vrata bedrene kosti, širinu glave bedrene kosti utječu različiti geni (32). Pretraživanje genoma pokazalo je povezanost nekih kromosomskih regija s različitim parametrima koštane geometrije, a veza je bila spolno određena. (33). Pri tome te regije nisu bile povezane s BMD-om.

Od 1994. godine, kada su prvi puta objavljeni rezultati ispitivanja povezanosti polimorfizma gena za VDR i BMD-a, provedena su brojna ispitivanja utjecaja polimorfizama različitih gena (uključenih u izgradnju kosti, postizanje koštane mase, formiranje i održavanje koštane strukture, pregradnje kosti i oblika kosti) na BMD, rizik nastanka osteoporoze i osteoporotičnih prijeloma. Rezultati ovih ispitivanja su kontradiktorni. Procjenjuje se da je utjecaj jednog polimorfizma na koštanu masu skroman, svega oko 0,2 do 0,5% , najviše do 2 % (34).

Koštana masa je značajno povezana s rizikom prijeloma. Procjenjuje se da je oko 60-85% koštane mase genetski determinirano (35,36). Nasljedna komponenta utječe na 70-85% BMD-a (engl. bone mineral density = mineralna gustoća kosti) kralježnice, 50-60% BMD-a kostiju donje trećine podlaktice (37,13,38) i 60-85% geometrije vrata bedrene kosti (6,39). Drugi važan parametar kosti povezan s lomljivošću je geometrija kosti, koja je također u visokom postotku genetski određena, a osim nje važnu ulogu ugra struktura kosti i mikroarhitektura. Od 1994. godine do 12.10.2006. godine objavljen je 731 članak u kojem je ispitivan odnos 91 gena i BMD-a, a broj gena čiji polimorfizmi su ispitivani do rujna 2007. godine povećao se na 100. Najčešće je ispitivan odnos BMD-a i polimorfizama gena za vitamin D receptor (VDR), estrogeni receptor alfa (ERα) i alfa 1 lanac kolagena tipa 1 (COl1A1), a rezultati su kontradiktorni. Utjecaj jednog polimorfizma na BMD je vrlo slab. Procjenjuje se da geni za VDR, ER i COL1A1 zajedno utječu na manje od 5% nasljedne komponente BMD-a (40). Genetski čimbenici značajno utječu na ITM (indeks tjelesne mase), dob menarhe (41) i menopauze (42) koji su također povezani s rizikom nastanka osteoporoze. Procjenjuje se da je nasljednost razine PTH i 1,25-dihidroksivitamina D 60-

65%, biljega koštane pregradnje, kao što su osteokalcin i koštani izoenzim alkalne fosfataze 29% i 74% (43).

Još nejasnija je uloga genetskih čimbenika u nastanku prijeloma kosti. Ustanovljena je genetska osnova sklonosti prijelomima koja nije povezana s koštanom masom, što govori za utjecaj brojnih drugih čimbenika koji utječu na rizik prijeloma, kao što je pad (u čijoj osnovi također mogu biti i genetski čimbenici), mišićna snaga, ravnoteža i motorička spretnost, te različiti parametri kvalitete kosti. U žena u ranom postmenopauzalnom periodu nađena je i nasljedna komponenta koja utječe na rizik pada, što može imati posljedice na rizik prijeloma (44). Populacijske studije su pokazale povećani rizik prijeloma u osoba s prijelomima kosti u obiteljskoj anamnezi (45,46). Više studija pokazalo je obiteljsku povezanost prijeloma (47,48,49,50,51). Na osnovu studija blizanaca i obiteljskih studija procijenjeno je da je nasljednost prijeloma 25-35% (52,53). Pri tome često polimorfizmi gena koji su povezani s BMD-om nisu povezani s rizikom prijeloma (54,55,56). Genetska povezanost niskog BMD-a i prijeloma je niska (57,58). Cummings je našao dvostruko veći rizik prijeloma kuka u bolesnica s osteoporozom čije majke su imale prijelom kuka (59). Nađeno je da rizik prijeloma raste u kćeri majki koje su prije 50 godine života zadobile osteoporotične prijelome (60,61,62). Meta analiza Kanisa i sur. pokazala je da je anamneza prijeloma kuka u roditelja bila povezana sa značajnim rizikom kako prijeloma kuka (RR=1,54), tako i svih osteoporotičnih prijeloma (RR=2,27) (63). Kannus i sur. u 25 godišnjoj prospektivnoj longitudinalnoj studiji s 2308 monozigotnih i 5241 dizigotnim blizanačkim parom (15 098 osoba) nisu dokazali utjecaj genetskih čimbenika na sklonost osteoporotičnim prijelomima u starijih žena niti u muškaraca. Procijenili su da je utjecaj okoliša na sklonost prijelomima preko 60% (64). Međutim, MacGregor i suradnici su iz istih podataka dobili statistički značajan utjecaj genetskih čimbenika na rizik nastanka osteoporotičnih prijeloma u muškaraca (53). Procijenili su da su genetski čimbenici odgovorni za oko 35% rizika prijeloma na bilo kojem mjestu u tijelu. Genetska korelacija između BMD-a i rizika osteoporotičnog prijeloma je vrlo niska. Deng i suradnici nisu našli statistički značajnu genetsku korelaciju između BMD-a i rizika osteoporotičnih prijeloma, utjecaj je bio manji od 1% (65). Andrew i suradnici našli su povezanost prijeloma podlaktice s genima koji ne utječu na BMD (66). Slične rezultate dobili su i drugi autori koji su našli povezanost nekih gena (VDR, ER, COL1A1) i njihovih polimorfizama s prijelomima, ali ne i s BMD-om, što upućuje na postojanje drugih determinanti lomljivosti kosti koje imaju genetsku osnovu (34,67,68,69,70,71,72).

Van Meurs i suradnici našli su da LRP5 1330-valin varijanta u muškaraca nosi 60% veći rizik osteoporotičnih prijeloma, a jednako tako i LRP5 1062-valin varijanta. Nostelji oba rizična alela LRP5 i LRP6 imali su 140% ($p = 0.004$) veći rizik u odnosu na one koji nisu imali ove rizične alele, što "objašnjava" 10% prijeloma u muškaraca. Rizik prijeloma bio je neovisan o dobi, visini, težini i BMD-u. U žena su ove povezanosti bile slabije izražene i manje konzistentne (73).

Po mišljenju E. Seemana progres u genetici koštane lomljivosti je spor, jer je fenotip slabo definiran (74). Prijelomi su previše rijetki da bi omogućili detekciju povezanosti s genima koji reguliraju strukturalne determinante koštane čvrstoće, za što je potreban izuzetno veliki uzorak ispitanika, koji bi trebao biti veći od 10.000 ispitanika da bi studija imala dovoljnu statističku snagu (75).

Osim brojnih studija u kojima je ispitivan utjecaj genskih polimorfizama na BMD u postmenopauzalnih žena, učinjen je i mali broj studija u kojima je ispitivan utjecaj genskih polimorfizama na BMD u bolesnika sa sekundarnom osteoporozom. Moguće je da osnovna bolest modificira utjecaj nekog genskog polimorfizma na BMD ili rizik nastanka prijeloma, pa rezultati ne moraju biti jednaki onim u bolesnica s primarnom osteoporozom, a mogu pridonijeti boljem razumijevanju patofizioloških procesa uključenih u proces pojačanog gubitka koštane mase, odnosno povećanog rizika prijeloma kosti. Također, svaki oblik sekundarne osteoporoze se međusobno razlikuje po patofiziološkim procesima pa je moguće da i genetska osnova različito utječe na procese koji uzrokuju nastanak osteoporoze. U različitim oblicima sekundarne osteoporoze isti geni i genski polimorfizmi mogu vršiti različit utjecaj na patofiziološke procese koji uzrokuju nastanak osteoporoze. S druge strane, u različitim oblicima sekundarne osteoporoze do izražaja mogu doći različiti geni i njihovi polimorfizmi, tako da različiti polimorfizmi mogu imati utjecaj na različite oblike sekundarne osteoporoze. Zato je važno ispitivati genetsku osnovu svakog oblika sekundarne osteoporoze posebno, a važno je nakon toga porediti rezultate ovakvih ispitivanja jer bi oni mogli dati uvid u genetske, ali i negenteske specifičnosti patogeneze različitih oblika osteoporoze. Hipertireoza je jedan od poznatih i čestih uzroka sekundarne osteoporoze. Do sada je učinjen veliki broj studija u kojima je ispitivana patogeneza razvoja osteoporoze u hipertireozi. Međutim, malo se zna o genetskoj osnovi sekundarne osteoporoze uzrokovane hipertireozom.

1.1. Definicija osteoporoze

Termin „osteoporoza“ prvi puta se počeo koristiti u Francuskoj i Njemačkoj u 20-tim godinama 19. stoljeća (76). Podrijetlo riječi je iz grčkog jezika od riječi osteon (kost) i poros (mala rupa). U prvoj polovini 20. stoljeća (1930-tih godina) Albright je definirao osteoporozu kao „premalo kalcificirane kosti“.

Definicija osteoporoze po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) iz 1991. godine zasnovana je na histološkom pregledu bioptata kosti: osteoporoza je sistemska metabolička bolest kosti karakterizirana smanjenom koštanom masom i promjenama u mikroarhitekturi kosti što dovodi do povećane lomljivosti kosti i povećanja rizika prijeloma (77). Ova definicija uzima u obzir koštanu masu i koštanu strukturu. Međutim, biopsija kosti je invazivna metoda, a histomorfometrijski pregled dobivenog uzorka tkiva kosti može se obaviti samo u rijektim centrima s posebno educiranim osobljem. Proces je skup i mnogim centrima nedostupan, a zahtijeva i određeno vrijeme za izvođenje (oko mjesec dana), zbog čega se biopsija kosti kao metoda postavljanja dijagnoze osteoporoze koristi tek u rijetkim slučajevima. Kompresivni prijelomi trupova kralježaka histomorfometrijski su povezani sa smanjenjem volumena trabekularne kosti uzete biopsijom u području krila bočne kosti ispod 15% , dok je u mladih osoba taj volumen 20-30%.

Počeci koštane denzitometrije su u 1970-tim. Konstruiranje prvih denzitometara (aparata za mjerenje mineralne gustoće i mineralnog sadržaja kosti), primjenjivih u kliničkom radu (1987.god.), i njihovo usavršavanje, te sve češće korištenje stvorilo je potrebu za promjenom definicije osteoporoze. Nakon konsenzusa usvojenog na IV Međunarodnom simpoziju o osteoporozi u Hong Kongu od 1-2. travnja 1993. godine (78), Svjetska zdravstvena organizacija je 1994. godine prihvatila novu definiciju osteoporoze (79). Osteoporoza u žena je definirana prema denzitometrijskom mjerenju, kao vrijednost BMD-a koja je najmanje 2,5 SD manja od prosječne vrijednosti za mlade zdrave žene (T-score $\leq$ -2,5).

Ova praktična definicija osteoporoze zasnovana je na denzitometrijskom mjerenju mineralne gustoće kosti i mineralnog sadržaja kosti. Denzitometrijsko mjerenje mineralne gustoće kosti (BMD) vrši se aparatima (denzitometrima) DXA metodom (engl. dual-energy x-ray absorptiometry = denzitometrija pomoću x-zraka 2 različite energije). Rezultati se iskazuju u apsolutnim vrijednostima u g/cm^2 i kao T score koji predstavlja odstupanje rezultata mjerenja od prosječnog vršnog BMD-a koji je karakterističan za mlade djevojke (20-25 godina), iskazano u standardnim devijacijama. Rezultati koji su u rasponu T score-a

između +1 i -1 označavaju normalnu koštanu masu. T score između -1 i -2,5 označava osteopeniju, a T score ≤ -2,5 osteoporozu. Međutim, problem je nedostatak referentne vrijednosti za djecu, muškarce i različite etničke skupine.

Ova definicija omogućila je masovno korištenje denzitometrije kao osnovne dijagnostičke metode, čime je denzitometrija postala „zlatni standard“ u dijagnostici osteoporoze. Obzirom da je denzitometrija brza, neinvazivna metoda s minimumom zračenja (4-6 mRem-a), relativno precizna (greška mjerenja je 1-2%) i reproducibilna metoda, usvajanje ove praktične definicije omogućilo je masovno korištenje denzitometrije u dijagnostici osteoporoze i praćenju učinka liječenja. Međutim, ubrzo su uslijedile primjedbe i inicijative za promjenu definicije zasnovane na činjenici da BMD nije jedini važan predskazatelj osteoporotičnih prijeloma i da u obzir treba uzeti i kvalitet kosti (80,81). Uvažavajući potrebu da se naglasi i komponenta kvalitete kosti u mehanizmu nastanka osteoporotičnih prijeloma Američki institut za zdravlje usvojio je 2000. god. (NIH konsenzus) novu definiciju osteoporoze u kojoj se osim smanjene koštane mase navodi i promijenjena mikroarhitektura kosti i kvalitet kosti koji uzrokuju smanjenu čvrstoću kosti i veću lomljivost (82). „Osteoporoza je definirana kao koštani poremećaj karakteriziran smanjenom čvrstoćom kosti koja povećava rizik prijeloma. Koštana čvrstoća primarno reflektira integraciju koštane gustoće i kvaliteta. Koštana gustoća je izražena u gramima minerala po površini ili volumenu. Koštani kvalitet je definiran arhitekturom, pregradnjom, nakupljanjem oštećenja i mineralizacijom. Osteoporoza je značajan čimbenik rizika prijeloma, pa se prijelom događa kada sila koja uzrokuje oštećenje, kao što je trauma, djeluje na osteoporotičnu kost“.

Centralni problem u osteoporozi je povećana lomljivost kosti. Dva su osnovna uzroka povećane lomljivosti: jedan je smanjena koštana masa, a drugi smanjen kvalitet kosti. Kvalitet kosti je složen pojam, još uvijek do kraja nerazrađen, ali pod njim se podrazumijevaju sva svojstva kosti koja utječu na koštanu lomljivost, osim koštane mase. Kvalitet kosti obuhvaća:

- strukturu kosti
- debljinu korteksa
- broj koštanih gredica
- debljinu koštanih gredica
- usmjerenje koštanih gredica
- broj mikrofraktura koštanih gredica
- brzinu koštane pregradnje

Značajan je i utjecaj geometrije kosti na njenu lomljivost.

Još složenije je pitanje endostealnog remodeliranja i periostalne apozicije kosti, te volumena kosti formirane i resorbirane po svakoj BMU (engl. basic multicellular unit = bazičnoj multicelularnoj jedinici) koji značajno utječu na čvrstoću kosti, odnosno njenu lomljivost.

U nekim ispitivanjima povezanosti polimorfizama pojedinih gena i BMD-a te prijeloma kostiju nađena je povezanost polimorfizama s lomljivošću, a bez značajne povezanosti s BMD-om (54,55,56,57,58). Ispitivanje utjecaja niskog BMD-a na lomljivost kosti u bolesnika sa steroidnom osteoporozom pokazalo je da je niski BMD bio skroman prediktor prijeloma (83). Štoviše, u bolesnika s Crohnovom bolešću prijelomi kralježaka događaju se jednakom učestalošću u bolesnika s niskim BMD-om, kao u bolesnika s normalnim BMD-om. Porast indeksa tjelesne mase, C-reaktivnog proteina i razine paratireoidnog hormona imao je prediktivnu vrijednost za nastanak prijeloma kralježaka, a ne niski BMD (84). Također, ispitivanja učinka alendronata u liječenju osteoporoze pokazala su značajno veću povezanost s prijelomima nego s BMD-om. Samo 16% smanjenja rizika vertebralnih prijeloma objašnjivo je promjenom BMD-a kralježnice, što ukazuje na postojanje drugih čimbenika rizika važnih za nastanak prijeloma, a koji su iz grupe svojstava obuhvaćenih terminom kvalitete kosti (85). Procjenjuje se da je utjecaj niskog BMD-a na nastanak osteoporotičnih prijeloma vrlo skroman. Oko 10-44% specifičnih tipova osteoporotičnih prijeloma može se pripisati niskom BMD-u, a samo oko 15% svih osteoporotičnih prijeloma može se povezati s niskim BMD-om (86). Različita svojstva kosti, kao što su: BMD, promjer kosti, nagib vrata bedrene kosti, debljina kortikalne kosti, broj trabekula i njihova usmjerenost, brzina koštane pregradnje i sl. povezana su s različitim genima i njihovim SNP-ovima (engl. single nucleotide polymorphism = polimorfizam jednog nukleotida). Geni koji su povezani s osteoporotičnim prijelomima i oni koji su povezani s BMD-om nisu nužno isti (87).

Sve više je ispitivanja u kojima se u obzir uzimaju biomehanička svojstva kosti, a koštana pregradnja promatra kao nužan mehanizam procesa prilagodbe koštane strukture i mikroarhitekture kosti sili gravitacije kao i dominantnih mišićnih sila koje djeluju na kost i stimuliraju njenu pregradnju (88,89,90,91). Radi se o složenom mehanizmu čije dijelove još uvijek dovoljno ne poznajemo, ali to područje obećava dodatne važne spoznaje o lomljivosti kosti u bolesnika s niskom koštanom masom, odnosno osteoporozom.

1.2. Epidemiologija osteoporoze

Podaci o učestalosti osteopenije i osteoporoze razlikuje se od zemlje do zemlje. Procjenjuje se da oko 8% stanovništva razvijenih zemalja boluje od osteoporoze. Oko 80% bolesnika s osteoporozom su žene, a oko 20% muškarci. Procjenjuje se da u SAD oko 54% postmenopauzalnih žena imaju osteopeniju, a 30% osteoporozu (92).

Centralni problem osteoporoze su osteoporotični prijelomi. Procjenjuje se da će do kraja života oko 30% žena i 12% muškaraca zadobiti osteoporotični prijelom neke kosti (72).

Doživotni rizik za bilo koji prijelom u postmenopauzalnih bijelih žena u SAD je oko 70%. Za prijelom kuka, kralješka i palčane kosti rizik je oko 40% za bijele žene i oko 13% za muškarce. Za prijelom vrata bedrene kosti rizik je oko 17-18% u postmenopauzalnih žena i 6% u muškaraca (91,93,94). Oko 32% žena i 17% muškaraca koji žive do 80 godine zadobiti će prijelom vrata bedrene kosti. Rizik za prijelom trupa kralješka u bijelih žena je oko 35%, a 17% za Collesovu frakturu (91,95). Prijelom vrata bedrene kosti povezan je s jednogodišnjim rizikom smrti od 15-25%. I u slučaju kliničkih prijeloma trupova kralježaka, kada se bolesnici zbog njih moraju hospitalizirati, također je povećan rizik smrti (96,97). U SAD i Skandinaviji incidencija prijeloma je veća nego u Centralnoj Europi.

Podaci o prijelomima znatno se razlikuju od studije do studije ovisno o načinu prikupljanja podataka o prijelomima, metodama i kriterijima dijagnosticiranja prijeloma. Najveće su pogreške u procjeni prijeloma trupova kralježaka. Značajno se razlikuju podaci dobiveni na osnovu anamnestičkih podataka o pogrbljenosti i smanjenju tjelesne visine od podataka dobivenih mjerenjem visine tijela i na kraju radiološke dijagostike trupova torakalnih i slabinskih kralježaka. Najobjektivnija metoda je radiološka. Međutim, i u radiološkoj procjeni postojanja kompresivnih fraktura trupova kralježaka koriste se različite metode, a mjerenja se mogu vršiti semiautomatizirano ili ručno, što također utječe na preciznost i pouzdanost dobivenih podataka. Razvijene su različite metode za procjenu postojanja kompresivnih prijeloma trupova kralježaka. Radiološka dijagnostika prijeloma trupova kralježaka može se izvoditi po Genantu, Eastell-Meltonu, McCloskey-Kanisu, Hedlund-Gallagher-u i drugim autorima (98,99,100,101,102,103,104). Razlikuju se tri tipa deformiteta: klinasti oblik, bikonkavni deformiteti i kompresija cijelog kralješka. Moguće je koristiti i kompjuteriziranu tomografiju i/ili magnetsku rezonancu u dijagnostici prijeloma i procjeni stupnja kompresivnih prijeloma trupova kralježaka, ali se ove metode ne koriste u epidemiološkim ispitivanjima.

Siris i sur. ispitivali su jednogodišnji ishod neprepoznate osteoporoze na nastanak prijeloma. Ispitivanje je provedeno među 200.160 ambulantno vođenih žena dobi 50 godina ili više, koje do tada nisu imale dijagnosticiranu osteoporozu. Po kriterijima SZO 39.6% imalo je osteopeniju (T score od -1 do -2,49), a 7.2% imalo je osteoporozu (T score $\leq$-2,5). Denzitometrija je učinjena u području pete, prsta i podlaktice. Rezultati su pokazali da je osteoporoza bila povezana sa stopom prijeloma približno 4 puta većom nego normalni BMD (rate ratio, 4.03; 95% confidence interval [CI], 3,59-4,53), a osteopenija s 1,8 puta većom stopom (95% CI, 1,49-2,18) (105).

Lindsey i sur. pokazali su da se prevalencija prijeloma u populaciji brzo povećava unatoč tretmanu kalcijem i vitaminom D. Žene s osteoporozom bez prijeloma imale su 7,7% rizik za nastanak vertebralnih prijeloma tijekom godinu dana. Poslije 5 godina 33% će razviti vertebralne prijelome, od kojih će 11% imati $\geq$2 prijeloma. Poslije 10 godina 55% će imati prijelome kralježaka, od kojih će 29% imati $\geq$2 prijeloma. Smanjenje rizika prvog prijeloma sa 8% na 2% smanjuje 5-godišnju incidenciju prijeloma sa 33% na 10% (106).

Prema podacima Pećine i suradnika u Hrvatskoj je 2005. godine bilo 5489 prijeloma kuka od kojih su 382 bolesnika (6,96%) umrla zbog komplikacija prijeloma. Ukupno je 97,38% bolesnika koji su umrli bilo starije od 65 godina (107). Nije poznato kolika je prevelanecija osteoporoze i incidencija osteoporotičnih prijeloma u našoj zemlji, ali iz ovih podataka je vidljivo da je visoka dob povezana s jasno povećanim rizikom smrtnog ishoda u osoba s prijelomom kuka.

Doživotni rizik prijeloma kuka u nekim Europskim zemljama prema podacima IOF (The International Osteoporosis Foundation) iz 1997. godine iznosio je:

Država	žene	muškarci
Švedska	19 %	13 %
Island	12 %	6 %
Švicarska	8 %	5 %
Velika Britanija	7 %	3 %
Finska	7 %	5 %
Bivša SR Njemačka	6 %	3 %
Nizozemska	6 %	3 %
Poljska	4 %	3 %
Jugoslavija	4 %	4 %
Portugal	3 %	3 %
Malta	3 %	2 %

Vidljivo je da je rizik prijeloma kuka bio najveći na sjeveru Europe, a da se prema jugu smanjivao, što još uvijek nije razjašenjeno. Moguće je da je jači deficit vitamina D na sjeveru barem dijelom odgovoran za ovakvu distribuciju rizika prijeloma.

Incidencija prijeloma kuka u svijetu, na tisuću stanovnika iznosi:

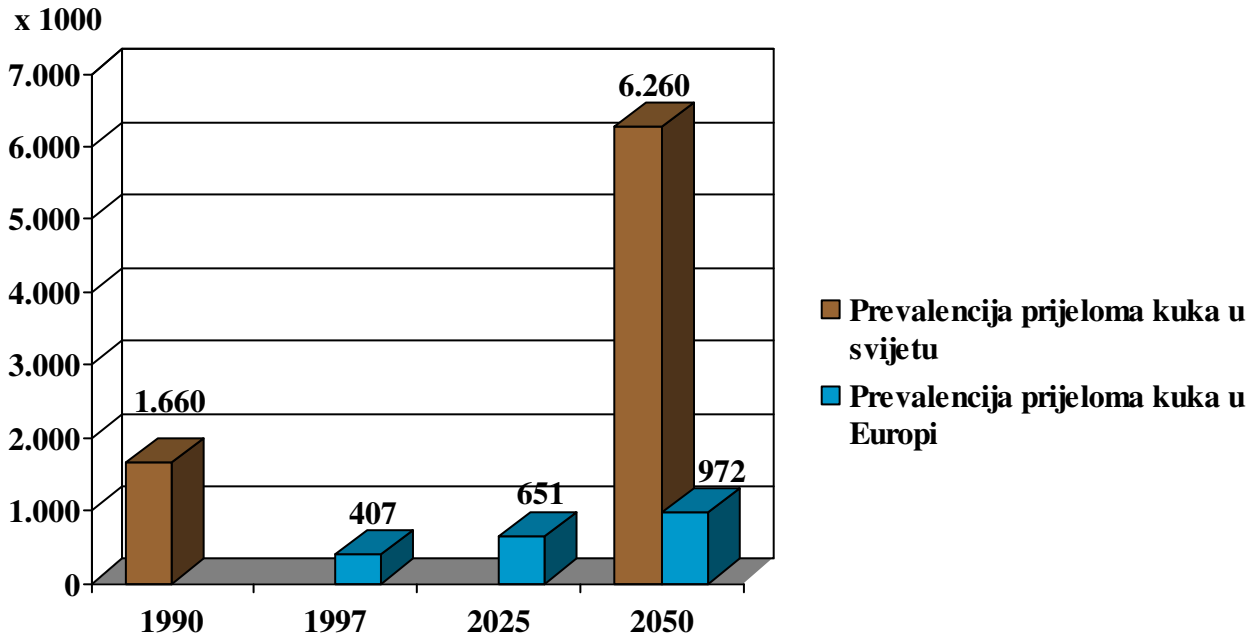
- SAD: 1/1000
- Japan: 0,4/1000
- Finska:
  - 11/1000 >70 god.
  - 200/1000 >80 god.
  - <500/1000 >90 god.
- Švedska: 50/1000
- Hong Kong: 13/1000
- Poljska: 5/1000
- Malta : 5/1000

Broj prijeloma kosti u Europi 1997 iznosio je:

- kuk: 407.000
- kralješci: 270.000
- donji dio palčane kosti: 340.000

Prema rezultatima EVOS studije: 12,2% osoba starijih od 50 god. ima 1 ili više radiološki dijagnosticiranih deformiteta kralježaka, jednako u oba spola (108). Do 65. godine deformiteti trupova kralježaka češći su u muškaraca, a nakon 65 godine u žena. Deformiteti su najčešći u srednjem dijelu torakalne kralježnice i slabinskoj kralježnici. Po tipu prijeloma najčešći su rubni deformiteti odnosno klinasti oblik kralješka, dok su rjeđi bikonkavni kralješci, a najrjeđi su deformiteti u obliku zdrobljenog, komprimiranog kralješka. Većina bolesnika s deformitetima trupova kralježaka imaju jedan tip deformiteta (80%), rjeđe su oni kombinirani. Frekvencija deformiteta nije povezana s tipom deformiteta. Prijelomi kralježaka u žena starijih od 50 godina predstavljaju značajan čimbenik rizika za prijelom kuka (RR:4,5), dok nisu prediktori prijeloma kostiju distalnog dijela podlaktice. U muškaraca prijelomi kralježaka nisu prediktori nastanka prijeloma kuka (109). U Europi se tek 1/8 (12,5%) prijeloma kralježaka se dijagnosticira, dok se u SAD se dijagnosticira <1/3 prijeloma kralježaka (110). Predviđa se značajan porast broja prijeloma u budućnosti (Slika 1).

Slika 1. Projekcija porasta broja prijeloma kuka prema predviđanjima IOF-a iz 1997.



1.3. Etiologija osteoporoze

Osteoporoza nastaje kao posljedica pojačane koštane razgradnje i/ili usporene izgradnje kosti. Različiti su uzroci i mehanizmi nastanka osteoporoze, odnosno gubitka koštane mase i narušavanja kvalitete kosti. Koštana pregradnja je složen proces koji uključuje interakciju unutarnjih i vanjskih čimbenika modificiranu genetskim čimbenicima. Ova interakcija djeluje na aktivnost koštanih stanica, osteoblasta i osteoklasta.

Nasljedna komponenta obuhvaća niz gena uključenih u regulaciju aktivnosti osteoblasta i osteoklasta, odnosno enzima uključenih u biosintezu proteina, razgradnju organskog ili anorganskog matriksa, mikroarhitekturu kosti, geometriju i volumen kosti.

Čimbenici iz vanjske sredine, odnosno negenetski čimbenici koji utječu na koštanu masu i lomljivost kosti su: ženski spol, starija dob, pušenje, alkohol, crna kava, imobilizacija, različite bolesti i lijekovi. Važni čimbenici koji utječu na formiranje vršne koštane mase su unos kalcija, ekspozicija sunčevom svjetu i tjelesna aktivnost.

Etiopatogeneza osteoporotičnih prijeloma je složena. U njoj učestvuju vanjski i unutarnji čimbenici. Pad je osnovni vanjski čimbenik nastanka osteoporotičnih prijeloma.

Važnost pada vidljiva je iz rezultata EPOS studije, koja je pokazala da razlike u rezultatima učestalosti osteoporotičnih prijeloma između 30 centara u Europi dijelom ovise i o učestalosti pada, čime se može objasniti 24%, 14% i 6% varijacija incidencije prijeloma distalne podlaktice, prijeloma gornjih i donjih ekstremiteta između različitih centara (111). Zaključeno je da BMD sam ne može biti korišten za razlikovanje između rizika prijeloma gornjih ekstremiteta u populaciji bez uvažavanja varijacija u riziku pada specifičnih za populaciju i drugih čimbenika. Ove varijacije mogu reflektirati zajedničke čimbenike okoliša ili moguće genetske čimbenike koji učestvuju značajno u riziku prijeloma gornjih ekstremiteta u žena. (112). Uzroci i mehanizam pada također su složeni. Osim nepredvidivih okolnosti iz okoliša koje mogu utjecati na pad, neke okolnosti su predvidive, a brojni su „unutarnji" čimbenici od strane organizma same osobe koji mogu povećati rizik pada, kao što su: poremećaj ravnoteže (uzrokovan različitim uzrocima), slabovidnost, nagluhost, invalidnost, teške iscrpljujuće kronične bolesti, epilepsija, neurološke bolesti praćene poremećajem ravnoteže i koordinacije pokreta te otežanim kretanjem i druga patološka stanja. Među ostalim nađena je povezanost i s nekim genskim polimorfizmima (113).

Čimbenici rizika za nastanak osteoporotičnih prijeloma od strane kosti su: niska koštana masa, geometrija kosti, kvalitet kosti i genski polimorfizmi (114,115).

Najčešći uzrok ubrzane razgradnje kosti i nastanka osteoporoze je deficit spolnih hormona, i u žena i u muškaraca, mada sam deficit spolnih hormona nije dovoljan da dovede do osteoporoze, jer se osteoporoza ne razvija u svih postmenopauzalnih žena. U muškaraca je također, deficit muškog spolnog hormona vodeći uzrok osteoporoze. Međutim, u muškaraca ne dolazi do naglog smanjenja razine testosterona, kao što se događa s razinom estrogena u žena u perimeopauzi i postmenopauzi, nego se sekrecija testosterona postupno smanjuje tjekom starenja pa se i BMD smanjuje postupno. S druge strane, deficit testosterona javlja se znatno kasnije nego menopauzalni deficit estrogena u žena. Zato se i osteoporoza uzrokovana deficitom spolnih hormona u muškaraca javlja kasnije i u manjeg broja muškaraca, nego u žena. Osim testosterona na koštanu masu u muškaraca, također značajan utjecaj imaju i estrogeni. Moguće da je utjecaj estrogena na koštanu masu u muškaraca i veći nego testosterona. To pokazuju studije u kojima je deficit aromataze, enzima koji katalizira konverziju testosterona u estradiol, za posljedicu imao osteoporozu u muškarca, a primjena estradiola u terapiji osteoporoze u muškarca s deficitom aromataze uzrokovala je značajan porast koštane mase (116,117,118,119,120,121,122,123,124,125). Transdermalna primjena estrogena u terapiji bolesnika s osteoporozom i karcinomom prostate također uzrokuje porast

koštane mase (126). Na ubrzani gubitak koštane mase i nastanak osteoporoze djeluju i neke štetne navike, kao što su:

- pušenje
- alkohol
- crna kava
- nekretanje

Pušenje djeluje kao čimbenik rizika na nastanak osteoporotičnih prijeloma. Meta-analiza Kanisa i sur. sačinjena iz 10 studija na uzorku od 59,232 muškaraca i žena pokazuje da je utjecaj pušenja na rizik prijeloma veći nego što se može objasniti BMD-om, što znači da pušenje djeluje negativno i na kvalitet kosti. Nižim BMD-om može se objasniti samo 23% rizika prijeloma povezanih s pušenjem. Utjecaj pušenja na rizik prijeloma jače je izražen u muškaraca za sve ispitivane regije, osim za kuk. Bivši pušači imaju veći rizik prijeloma nego nepušači, ali manji od osoba koje su pušile u vrijeme ispitivanja (127).

Kanis i sur. učinili su također i meta-analizu sačinjenu iz 3 studije na 5,939 muškaraca i 11,032 žena vezanu za konzumiranje alkohola i utjecaj na BMD i prijelome. I u ovom slučaju utjecaj na prijelome nije se mogao jednostavno objasniti preko utjecaja na BMD i bio je značajniji od utjecaja na BMD. Povezanost uzimanja alkohola i prijeloma javlja se u osoba koje konzumiraju više od 2 jedinice alkohola dnevno i nije linearna, a nije povezana s dobi i spolom (128).

Albrand i suradnici proveli su ispitivanje s ciljem da identificiraju neovisne prediktore svih osteoporotičnih prijeloma u zdravih postmenopauzalnih žena. Pratili su prosječno 5,3 godine 672 zdrave žene prosječne dobi 59 godina. Incidencija osteoporotičnih prijeloma bila je 21/1000. Identificirali su 7 neovisnih prediktora osteoporotičnih prijeloma: dob $\geq$ 65 godina, bivši padovi, ukupna mineralna gustoća u području kuka (BMD) $\leq$ 0,736 g/cm^2, snaga stiska lijeve šake $\leq$ 0,60 bar, prijelomi u majke, slaba tjelesna aktivnost i prethodni prijelomi nakon slabe traume. Nasuprot tome, tjelesna težina, gubitak tjelesne težine, pušenje, neuromuskularna koordinacija i hormonsko nadomjesno liječenje nisu bili neovisni prediktori svih osteoporotičnih prijeloma. Po mišljenju autora, ovi čimbenici čini se da reflektiraju kvalitet koštane strukture (prethodni osteoporotični prijelomi), stil života (tjelesna aktivnost), mišićnu funkciju i općenito zdravlje osobe (snaga stiska šake), nasljednost (prijelomi u majke), padove i starenje (129).

1.4. Podjela osteoporoze

Po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije osteoporoza se može podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna osteoporoza je najčešći oblik osteoporoze, a dijagnoza se postavlja kada drugi poznati uzroci osteoporoze nisu prisutni. Ona je definirana također i prema dobnim skupinama. Sekundarna osteoporoza povezana je s drugim bolestima ili lijekovima. Različiti čimbenici mogu uzrokovati sekundarnu osteoporozu. Sekundarna osteoporoza događa se u skoro 2/3 muškaraca s osteoporozom, više od polovine premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena s osteoporozom i oko petine postmenopauzalnih žena s osteoporozom (130). (Tablica 1.).

Tablica 1. Klasifikacija osteoporoze prema Svjetskoj zdravstvenoj orgranizaciji:

I Primarna osteoporoza:
1. Juvenilna (u dječaka i djevojčica pretpurbertetske dobi, spontano se zaustavlja s početkom puberteta)
2. Idiopatska (u mladih odraslih osoba, nepoznatog uzroka)
3. Postmenopauzalna (kasna komplikacija postmenopauzalnog deficita estrogena, događa se 15-20 godina nakon menopauze)
4. Senilna (više od 20 godina nakon menopauze, odnosno poslije 70 godine)

II Sekundarna osteoporoza
1. Endokrinološke bolesti
    a) hipertireoza
    b) hiperparatireoidizam
    c) Cushingov sindrom
    d) hipopituitarizam
    e) diabetes mellitus – tip 1
    f) hipogonadizam
    g) prolaktinom
2. Bolesti koštane srži:
    a) multipli mijelom
    b) leukemije
    c) metastatske bolesti

d) Gaucherova bolest
e) talasemija

3. Kronične bolesti:
    a) uremija
    b) anorexia nervosa
    c) mastocitoza
    d) Crohnova bolest i druge crijevne bolesti s malapsorpcijom
    e) reumatoidni artitis
    f) imobilizacija
    g) ciroza jetre
4. Deficitarna stanja:
    a) nedostatak vitamina D
    b) nedostata vitamina C
    c) nedostatak kalcija
5. Urođene greške metabolizma:
    a) homocistinurija
    b) osteogenesis imperfecta
6. Lijekovi i neke druge tvari
    a) hormoni štitnjače kada se daju u tireosupresivne svrhe
    b) glukokortikosteroidi
    c) antiepileptici
    d) heparin
    e) imunosupresivi
    f) alkohol

Po Konsenzusu Američkog instituta za zdravlje iz 1984. godine primarna osteoporoza je poremećaj povezan s dobi karakteriziran smanjenom koštanom masom sa povećanom sklonošću prijelomima u odsustvu drugih prepoznatljivih uzroka gubitka kosti (131).

Po Klasifikaciji Mayo klinike (132) iz 1986. godine, osteoporoza se može klasificirati u tip I i tip II:

- Tip I — postmenopauzalna osteoporoza — pogađa žene poslije menopauze u dobi od 55 do 75 godina, (omjer žene: muškarci = 6:1) i povezana je se prijelomima kralježnice i podlaktice

- Tip II — osteoporoza povezana sa starijom dobi ili senilna osteoporoza — pogađa muškarce i žene (omjer žene:muškarci = 2:1) starije od 70 godina i povezana je s prijelomima kuka i kralježnice

Svaki tip osteoporoze ima niz specifičnosti: posebnu epidemiologiju i patofizološke mehanizme, poseban mehanizam povećanja lomljivosti kosti i rizika nastanka prijeloma na specifičnim mjestima.

U tipu I prvenstveno se gubi trabekularna kost, dok se u tipu II dominantno gubi kompaktna kost.

1.5. Patofiziologija osteoporoze

1.5.1. Struktura kosti

Koštano tkivo je građeno od koštanog matriksa i koštanih stanica. Koštani matriks je građen od organske i anorganske komponente. Organski matriks sačinjava dominantno tip I kolagena. Kolagen je odgovoran za elastičnost, fleksibilnost i snagu kosti na djelovanje sila vlaka. Osim kolagena organski matriks manjim dijelom (10-15%) sačinjavaju i još neke molekule kao što su: proteoglikani (glukozamini: hondroitin sulfat i heparin sulfat), osteonektin, alkalna fosfataza, fibronektin, trombospondin, vitronektin, osteopontin, koštani sijaloprotein, osteokalcin (koštani gla-protein), matriks gla-protein (MGP), protein S. Anorganski matriks sačinjen je od kristala hidroksiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$) koji je uložen između niti kolagena. Ovaj anorganski matriks daje kosti krutost, tvrdoću i snagu da izdrži djelovanje sila tlaka (kompresije). Različita raspodjela organskog i anorganskog matriksa u trabekularnom i kompaktnom koštanom tkivu rezultira i različitim svojstvima ova dva tipa kosti.

U koštanom tkivu nalaze se 4 tipa koštanih stanica: osteoblasti, osteociti, pokrovne stanice (engl.: lining cells) i osteoklasti. Osteociti i pokrovne stanice nastaju od osteoblasta koji su mezenhimalnog podrijetla (133). Osteoblasti se diferenciraju iz matičnih mezenhimalnih stanica pod utjecajem citokina: BMP, TGF-β, IL. PPARγ potiče diferencijaciju matične mezenhimalne stanice u smjeru adipocita, a spriječava njenu diferencijaciju u smjeru osteoblasta.

Na osteoblastima, ali ne i na osteoklastima, nalazi se LRP5 (engl. low desity lipoprotein-receptor-related protein 5 = protein povezan s receptorom za lipoproteine niske gustoće) koji je ključni regulator koštanog metabolizma, a svoj utjecaj ostvaruje preko Wnt signalnog puta (134,135). On ima centralnu ulogu u osteoblastogenezi i determinaciji koštane mase. Mutacija s gubitkom funkcije gena za LRP5 (engl. loss-of-function) uzrokuje osteoporozu. Poznata su 2 polimorfizma gena za LRP5, A1330 i V667M, povezana s BMD-om, a čiji utjecaj na koštanu masu je jače izražen u muškaraca (136,137,138). Na osteoblastima se nalaze i drugi receptori, kao što su receptori za PTH (PTHR) i vitamin D (VDR), preko kojih se odvija regulacija proliferacije i funkcije osteoklasta (tako što potaknuti osteoblati luče medijatore kojima djeluju na proliferaciju i funkciju osteoklasta),

Osteoklasti se diferenciraju iz stanica monocitno-makrofagnog podrijetla (139). Dva su signalna puta važna u diferencijaciji osteoklasta. Jedan se aktivira M-CSF-om (engl.: macrophage colony-stimulating factor = makrofagni čimbenik koji potiče kolonije) kojeg luče okolne stromalne stanice. Drugi važan signalni put za diferencijaciju osteoklasta aktivira se kada se RANKL [receptor activator of nuclear factor-B (RANK) ligand = cirkulirajuća molekula koja se veže za receptor koji aktivira nuklerani čimbenik-B], član TNF obitelji, veže za RANK (receptor koji aktivira nuklerani čimbenik-B) na membrani osteoklasta. Više transkripcijskih čimbenika su uključeni u diferencijaciju osteoklasta nakon aktivacije navedenih puteva: MITF (engl.microphthalmia-associated transcription factors = transkripcijski čimbenik povezan s mikoroftalmijom), TFE3 (engl. transcription factor E = transkripcijski čimbenik E), TFEB, TFEC (140). MITF regulira gene važne za osteoklastnu funkciju kao TRAP (engl. tartrate-resistant acid phosphatase = kisela fosfataza rezistentna na tartarat), katepsin K i OSCAR (engl. osteoclast-associated receptor = receptor pridružen osteoklastima), a može regulirati i druge transkripcijske čimbenike važne u osteoklastogenezi kao što su PU.1 i c-Fos.

Osteoblasti sintetiziraju i secerniraju organski matriks za novu kost, koji uglavnom sadrži kolagen (141). Oni formiraju sloj osteoida na preegzistentnoj mineraliziranoj površini kosti. Kada se sloj osteoida potpuno formira dolazi do njegove mineralizacije koja traje 10

dana. Osteoblasti sintetiziraju i izlučuju alkalnu fosfatazu i osteokalcin. Život osteoblasta iznosi od 3 mjeseca do 1.5 godinu. Kako formiranje kosti napreduje tako osteoblasti zaostaju uklopljeni u kost kao osteociti ili zaostaju na površini kao pokrovne stanice.

Osteociti nemaju sposobnost lučenja matriksa.

Pokrovne stanice (zaostale površinske stanice) mogu secernirati enzime koji razgrađuju tanku zonu kosti dovoljnu da dozvoli osteoklastima koštanu resorpciju.

Funkcija osteoklasta je resorpcija kosti. Resorpcija kosti je fiziološki proces koji je dio pregradnje kosti, a povezan je s koštanom izgradnjom. Životni vijek osteoklasta je oko 7 tjedana. Oni svoju aktivnost obavljaju u komunikaciji i koordinaciji s osteoblastima. Osteoklasti izlučuju solu kiselinu kojom razgrađuju anorganski matriks i enzime kojima razgrađuju organski matriks kosti. Prosječno trajanje resorpcije kosti u jednom resorpcijskom mjestu traje oko 4 tjedna.

Dva su osnovna tipa građe koštanog tkiva: spužvasta (trabekularna kost) i kompaktna kost. Od trabekularne kosti uglavnom su izgrađeni kralješci i epifizni dio velikih zglobova, dok je od kompaktne kosti sačinjen korteks dugih kostiju. Oko 80-90 % volumena kompaktne kosti je mineralizirano, dok je 15-25 % trabekularne kosti mineralizirano. Rezutat je da se najveći dio metabolizma kosti odvija u trabekularnoj kosti, dok kortikalna kost ima prvenstveno mehaničnu i protektivnu funkciju .

Dok je trabekularna kost izgrađena od guste mreže koštanih gredica, kompaktna kost je lamelarne građe. Raspodjela ova dva tipa koštanog tkiva po regijama je slijedeća:

- trup kralješka: 66% trabekularna, 34% kortikalna kost
- distalni radius: 20% trabekularna, 80% kortikalna kost
- kuk:
    - vrat bedrene kosti: 20% trabekularna, 80% kortikalna kost
    - trohanter: 50% trabekularna, 50% kortikalna kost
    - Wardov trokut: visok postotak trabekulrane kosti (nije precizno određen) (142,143)

1.5.2. Koštana pregradnja

Proces razgradnje i izgradnje kosti na istom području predstavlja jedinstven, povezan i koordiniran proces koštane pregradnje koji se odvija u jednoj jedinici koštane pregradnje. On ima dvostruku ulogu: omogućuje održavanje kvalitete kosti i s druge strane omogućuje aktivnu prilagodbu strukture kosti najčešćem djelovanju sila vlaka i tlaka čime se koštano tkivo promjenama svoje strukture prilagođava potrebama koje nameće tjelesna aktivnost i uobičajeni položaj tijela, odnosno gravitacijska sila. Proces pregradnje kosti odvija se kroz lokalne jedinice pregradnje kosti i traje doživotno. U skeletu se nalazi oko milijun takvih jedinica koštane pregradnje u različitim stadijima aktivnosti. „Stara" kost se resorbira, a na njeno mjesto dolazi novoformirana kost. Jedan ciklus unutar kojeg se kompletan skelet pregradi traje oko 10 godina. Tijekom 10 godina kompletna stara kost zamijeni se novom kosti. Proces koštane pregradnje je od izuzetnog značaja za održanje kvalitete kosti, jer omogućuje zamjenu stare kosti koja već trpi od zamora materijala novom svježom kosti, omogućuje uklanjanje mikrooštećenja, frakturiranih koštanih gredica i njihovu zamjenu novim koje slijede dominantne sile tlaka i vlaka. Tako se aktivno mijenja struktura kosti i prilagođava djelovanju dominantnih sila vlaka i tlaka, čineći kost manje lomljivom. U prosječnom skeletu svakih 10 sekundi započinje pregradnja u jednoj jedinici koštane pregradnje, a u drugoj se završava (144). U svakom trenutku oko 20% površine trabekularne kosti je u fazi remodeliranja, a remodeliranje će se dogoditi u prosjeku svakih 2 godine. To je poznato kao frekvencija aktivacije (145). U trabekularnoj kosti prosječan ciklus pregradnje u jednoj jedinici koštane pregradnje traje 3-6 mjeseci (146). U kortikalnoj kosti pregradnja kosti je sporija i traje duže.

Koštana pregradnja regulirana je hormonskim, nutritivnim, metaboličkim i mehaničkim čimbenicima, a regulacija se odvija preko citokina i u tijesnoj komunikaciji osteoblasta i osteoklasta. Od hormona koji aktivno reguliraju pregradnju kosti centralno mjesto zauzimaju paratireoidni hormon (PTH) i vitamin D, a važan je i utjecaj spolnih hormona (prvenstveno estradiola), hormona štitnjače, kalcitonina, hormona štitnjače, hormona rasta, IGF-1 i kortizola.

PTH i vitamin D su glavni regulatori metabolizma kalcija i koštane pregradnje. Njihovo djelovanje je međusobno povezano. PTH je hormon paratireoidnih žlijezda koje pomoću „kalcij-senzing receptora" (receptora koji registira razinu kalcija u krvi) registriraju

porast kalcemije. Porastom kalcemije dolazi do aktivacije ovih receptora što za posljedicu ima inhibiciju sinteze i lučenja PTH i sniženje kalcemije do normalne razine. Na hipokalcemiju paratireoidne žlijezde reagiraju pojačanom sintezom i izlučivanjem PTH koji djeluje na pojačanje aktivne apsorpcije kalcija u dvanaestniku i jejunumu, te uzrokuje pojačanu resorpciju kosti i pojačanu reapsorpciju kalcija u sabirnim kanalićima tubula bubrega. Na taj način uzrokuje porast razine kalcija u krvi. Na kost djeluju preko receptora za PTH koji se nalaze na površini osteoblasta, a nakon vezanja za receptor dolazi do aktivacije osteoblasta i lučenja medijatora koji djeluju na osteoklaste aktivirajući ih što dovodi do pojačane resorpcije kosti i oslobađanja kalcija u krv.

Vitamin D ne djeluje samo kao vitamin, nego i kao steroidni hormon. Njegova struktura je zajednička steroidnim hormonima (ciklopentanoperhidrofenantrenski prsten). On ima brojne funkcije u organizmu. Djeluje ne samo na metabolizam kalcija nego i na diferencijaciju stanica, inhibira proliferaciju stanica, a također djeluje i na fetalni razvoj. Vitamin D se najvećim dijelom sintetitzira u koži procesom fotosinteze u keratinocitima bazalnog ili spinoznog sloja. U njima pod utjecajem UV-B zraka valne duljine 290-315 nm, procesom fotosinteze iz 7-dehidrokolesterola nastaje previtamin D koji se konvertira u provitamin D (cis i trans formu). Cis forma provitamina D pretvara se u vitamin D. Kasnije se vitamin D može konvertirati iz cis u trans formu i obratno. U jetri se vrši hidroksilacija vitamina D u 25(OH)D koji se izlučuje u krv gdje se veže za DBP (engl. vitamin D binding protein = protein koji veže vitamina D) i vezan za njega krvlju stiže u bubrege. U bubrezima se pod utjecajem 5-hidroksivitamin D-1α-hidroksilaze koju luče stanice proksimalnih kanalića, pretvara u $1,25(OH)_2D_3$ (kalcitriol) koji je najaktivnija forma vitamina D. Vitamin D ima dva osnovna mehanizma djelovanja (koji su povezani s vrstom receptora preko kojeg djeluju i cis ili trans forme u kojoj se nalaze):

1. genomski (spori): regulacija genske transkripcije
2. negenomski: preko brzih puteva iniciranih membranskim receptorima (transkaltahia).

Receptori vitamina D (VDR) su nuklearni i membranski:

- VDR_{nuk} nalazi se u 33 ciljna organa/tipa stanica
- VDR_{mem} ima široku distribuciju. Uzorkuje aktivaciju *MAPK puta* koji integrira multiple intracelularne signale i regulira mnoge stanične funkcije kao staničnu proliferaciju i diferencijaciju

Cis forma je topiva u vodi i veže se za „brze“ membranske receptore, dok je trans forma vodonetopiva, lipofilna, i veže se za nuklearne receptore. Nakon vezanja vitamina D za VDR_{nuk}, kompleks se u promoter regiji ciljnog gena veže za “vitamin D response element” (VDRE = element koji reagira na vitamin D) i receptor za vitamin A (RXR) s kojim čini heterodimer. Tek tada se aktivira cijeli niz koaktivatora koji predstavljaju tzv. DRIP kompleks koji, nakon što se aktivira, pokreće bazalne mehanizme transkripcije gena koji kreću od prepisivanja TATA kodona. Nakon toga dolazi do transkripcije gena, sinteze mRNA, potom tRNA i biosinteze proteina koji je odgovoran za biološki učinak vitamina D u ciljnoj stanici i tkivu.

Osnovno djelovanje vitamina D je na metabolizam kalcija i pregradnju kosti. Vitamin D ubrzava aktivnu apsorpciju kalcija kroz enterocite dvanaestnika i jejunuma procesom transkaltahije (kalcij se prenosi kroz staničnu membranu u stanicu enterocita, tamo se u citoplazmi veže za kalbindin, protein nosač kalcija, i prenosi na suprotnu stranu stanice gdje se kroz staničnu membranu izlučuje iz stanice u cirkulaciju). Ovaj proces može značajno ubrzati aktivnu apsorpciju kalcija, mada treba istaći da u crijevima dominira pasivna apsorpcija kalcija, neovisna o djelovanju PTH i vitamina D. Vitamin D djeluje na sabirne kanaliće bubrega tako da stimulira reapsorpciju kalcija. Učinak vitamina D na kost je najslabiji. Osteoklasti nemaju VDR, nego se VDR nalaze na osteoblastima koji nakon vezanja vitamina D za njih aktiviraju osteoklaste i time stimuliraju razgranju kosti, čime se u cirkulaciju ubacuju nove količine kalcija. Međutim, ovo je slab mehanizam. Uz to vitamin D suprimira lučenje PTH direktnim učinkom preko VDR_{nuk} koji se nalaze u promoter regiji PTH gena, te indirektno tendencijom nastanka hiperkalcemije. S druge strane PTH djeluje na pojačanu sintezu kalcitriola u proksimalnim kanalićima bubrega stimulacijom aktivnosti 1α-hidroksilaze.

Osteoblasti luče RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) i osteoprotegerin (OPG), a na membrani osteoklasta nalaze se RANK (receptor activator of NF-kappaB) – članovi superobitelji TNFR (engl. tumour necrosis factor receptor = receptor čimbenika nekroze tumora) (147). Vezanje RANLK za RANK na osteoklastima uzrokuje aktivaciju osteoklasta i njihovo umnožavanje s pojačanom koštanom resorpcijom. Osteoprotegerin se također veže na RANK i ometa vezanje RANKL, pa uzrokuje slabljenje funkcije osteoklasta i njihovu apoptozu, što rezultira smanjenom resorpcijom kosti i povećanjem koštane mase (148,149,150)

Patofiziologija osteoporoze je složena. Uzroci i mehanizmi nastanka osteoporoze su različiti u različitim oblicima osteoporoze. Međutim, neke bitne značajke procesa gubljenja koštane mase i poremećaja koštane mikroarhitekture, te povećanja lomljivosti kosti su zajedničke, a to je pojačana aktivnost osteoklasta koja nadjačava aktivnost osteoblasta uzrokujući pojačan gubitak koštane mase. Pri tome su putevi pojačane aktivacije osteoklasta složeni i uključuju brojne citokine, te različite stanične signalne puteve. Različiti čimbenici mogu djelovati na bilo kojem mjestu ove složene mreže regulacije koštane pregradnje i utjecati na ubrzanje ili usporenje koštane pregradnje, odnosno na procese pojačane izgradnje ili razgradnje kosti.

1.6. Hipertireoza i kost

Von Recklinghausen je prvi, prije više od 100 godina (1891) uočio vezu između hipertireoze i osteoporoze (151). Među uzrocima sekundarne osteoporoze hipertireoza ima značajno mjesto. Hipertireoza se češće javlja u žena nego u muškaraca, a isto tako i osteoporoza, pa je i veza hipertireoze i osteoporoze više proučavana u žena nego u muškaraca. Učinak hipertireoze na koštanu masu jače je izražen u žena nego u muškaraca. Rezultati studija sugeriraju da koštana masa nije značajnije smanjena u muškaraca koji boluju od hipertireoze (152,153,154,155,156). Samo u jednoj studiji rezultati sugeriraju mogućnost dvostruko većeg rizika prijeloma kuka u muškaraca s prethodno preboljelom hipertireozom (157).

Hipertireoza uzrokuje umjereni gubitak koštane mase (1-2% godišnje). Do pojačanog gubitka koštane mase dolazi zbog ubrzanja koštane pregradnje, pri čemu je jače ubrzana razgradnja od izgradnje kosti. Dominantno se gubi koštana masa u području kortikalne kosti. Najčešće se razvija osteopenija. Jačina i trajanje učinka hipertireoze na koštanu masu ovise o tome nalaze li se bolesnice u vrijeme aktivne bolesti štitnjače u premenopauzalnom ili postmenopauzalnom periodu.

Hipertireoza u premenopauzalnih žena uzrokuje blaži gubitak koštane mase, koji uzrokuje nastanak osteopenije, rijetko osteoporoze (158,159,160). U bolesnica s

hipertireozom koja je počela u premenopauzalnom periodu, nakon postizanja remisije koštana masa se povećava i nakon najmanje 4 godine postiže se povratak na prvobitno stanje (161). Smanjenje BMD-a u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom je reverzibilno, bilo nakon medikamentoznog ili operativnog liječenja, dok smanjena koštana masa i povećan rizik osteoporoze zaostaju u žena u kojih je hipertireoza započela u postmenopauzi (157,158,159). Međutim, ispitujući dugoročni učinak liječenja ^{131}J na BMD, nakon postizanja eutireoze, Serraclara i sur. nisu našli značajne razlike u BMD-u u odnosu na menopauzalni status kada je hipertireoza dijagnosticirana. Našli su da u eutireoidnih postmeopauzalnih žena koje su prethodno liječene primjenom ^{131}J zaostaje niži BMD neovisno o etiologiji hipertireoze i vremenu postavljanja dijagnoze hipertireoze u odnosu na menopauzu, ali je BMD bio niži u žena u kojih je radioiodna terapija bila provedena u postmenopauzi što sugerira koristan učinak rane radioiodne terapije u premenopauzalnih žena na očuvanje koštane mase (162). Međutim, studija je provedena među samo 26 bolesnica pa ima nisku statističku snagu. S druge strane, ovo je ipak specifična podskupina bolesnica, pa je pitanje postojanja razlike u jačini i trajanju hipertireoze u ovoj uskoj skupini bolesnica u odnosu na cijelu populaciju bolesnica s hipertireozom, kao i mogućeg utjecaja radioaktivnog ioda na kost. Naime, poznato je da je učinak radiojodne terapije sporiji od učinka medikamentozne i kirurške terapije, što bi moglo utjecati i na dugoročni učinak hipertireoze na koštanu masu u bolesnica liječenih ovom metodom. Osim toga, liječenje radioaktivnim iodom u bolesnica s hipertireozom slijedi tek kao druga linija terapije, pa je za očekivati da je u njih hiperitreoza trajala duže nego u bolesnica liječenih drugim metodama, a što bi moglo imati učinka i na koštanu masu. Foldes i Ugur-Altum sa suradnicima ne nalaze snižen BMD u premenopauzalnih žena s endogenom subkliničkom hipertireozom, za razliku od postmenopauzalnih žena s endogenom subkliničkom hipertireozom koje su imale snižen BMD u područjima kortikalne kosti, što ukazuje na važnost menopauzalnog perioda čak i u ovako blagih, subkliničkih oblika hipertireoze (163,164). Međutim, Taushanova L i sur. nalaze snižen BMD u području kortikalne kosti (BMD vrata bedrene kosti i QUS proksimalne falanage, engl. quantitative ultrasonometry = kvantitativni ultrazvuk) i u premenopauzalnih bolesnica s endogenom subkliničkom hipertireozom (u poređenju s eutireoidnom premenopauzalnom kontrolnom skupinom), mada je BMD u premenopauzalnih bolesnica bio viši nego u postmenopauzalnih (165). Langdahl i sur. ne nalaze razlike u reakciji kosti na utjecaj hormona štitnjače između premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (166), što ukazuje na nekoštane čimbenike koji modificiraju posljedice utjecaja hipertireoze na koštanu masu u pre- i postmenopauzi. Među tim nekoštanim čimbenicima

dominantan je utjecaj estrogena, čija razina u krvi se značajno razlikuje prije i poslije menopauze, a značajno utječe na koštanu pregradnju.

U bolesnica u kojih se hipertireoza javlja u postmenopauzalnoj dobi češće se javlja osteoporoza, a koštana masa se nakon postizanja remisije ne normalizira, kao u premenopauzalnih žena (167). U žena starijih od 65 godina sa suprimiranim TSH (<0,1 mU/l) tri puta je povećan rizik prijeloma kuka i četiri puta prijeloma trupova kralježaka. Preboljela hipertireoza povećava dva puta rizik prijeloma kuka (168,169).

Tri su mehanizma djelovanja hipertireoze na kost, koji uzrokuju ubrzanu koštanu pregradnju i pojačan gubitak koštane mase:

1. **Direktno djelovanje hormona štitnjače na kost.**

Na osteoblastima i osteoklastima nalaze se receptori za T_3 (TR). Hipertireoza direktnim djelovanjem na kost uzrokuje ubrzanje koštane pregradnje, s ubrzanom i izgradnjom i razgradnjom kosti. Pri tome je intenzivnija koštana razgradnja, pa je ukupan učinak gubitak koštane mase. Pojačana aktivnost osteoblasta manifestira se porastom razine za kost specifične alkalne fosfataze, osteokalcina i razgradnih produkata kolagena u plazmi. Učinak T_3 na osteoklaste izgleda da se dominantno odvija posredno, preko osteoblasta. Iako na osteoklastima postoje TR, izgleda da je dominantan učinak u aktivaciji osteoklasta zasnovan na vezanju T_3 za TR na osteoblastima, nakon čega aktivirani osteoblasti induciraju pojačanu aktivnost osteoklasta. U prisustvu vitamina D_3, T_3 inducira ekspresiju RANKL u osteoblastima, koji je ključni osteoklastogeni citokin (170). Međutim, Kanatani i sur. sugeriraju da stimulatorni učinak T3 na formiranje osteoklasta nije posredovan RANKL/OPG sustavom. Oni ukazuju da T3 direktno stimulira osteoklastnu diferencijaciju najmanje dijelom pojačanjem regulacije c-fos proteina u osteoklastnim prekursorima (171). Učinak hormona štitnjače na kost odvija se preko TRα receptora (172). Gubitak koštane mase uzrokovan direktim učinkom hormona štitnjače preko TRα jači je nego gubitak uzrokovan deficitom TSH u hipertireozi. (172,173)

2. **Djelovanje TSH na kost.**

Nađeno je da receptori za TSH (TSHR) postoje na osteoblastima i prekursorima osteoklasta. U miševa kojima je izrezan gen za TSHR (TSHR -/-) nalazi se izrazito ubrzana koštana pregradnja i osteoporoza. Nadomjesna terapija hormonima štitnjače ne normalizira niti dužinu kostiju niti njihovu težinu ukazujući na to da ovi parametri ne ovise o T_3 i T_4. Smanjenje broja TSHR u heterozigota za 50% uzrokuje osteoporozu i fokalnu osteosklerozu,

iako je razina T_3, T_4 i TSH uredna. Nadomjesna terapija hormonima štitnjače uzrokuje dezorganizaciju kosti u području kralježaka i iregularno zadebljanje kortikalne kosti u dugim kostima. Kao znak brze koštane izgradnje nalazi se puna kost na svim mjestima. TSH inhibira nastanak i preživljenje osteoklasta atenuiranjem JNK/c-jun i NFκB. TSH inhibira i diferencijaciju osteoblasta i ekspresiju tipa 1 kolagena (174). Hase i sur. pokazali su da je antiresorptivni učinak TSH posredovan prvenstveno TNFα (175). Kasnije su Sampath i sur. postigli porast volumena kosti i poboljšanje koštane mikroarhitekture i čvrstoće u ovariektomiranih štakora sistemskom primjenom niske doze TSH (176). Ovaj mehanizam bi mogao barem dijelom biti uključen u negativni utjecaj hipertireoze, u sklopu koje se nalazi i suprimiran TSH, na koštanu masu.

Međutim, Papadimitriou i sur. nisu našli smanjenu koštanu masu u dva rođaka u dječjoj dobi s izoliranim deficitom TSH (177). Učinak TSH na humane osteoblaste vjerojatno nije značajan zbog slabe ekspresije TSH receptora na ljudskim osteoblastima (178). Ipak, nađena je genetska osnova povezanosti TSH i koštane mase u ljudi. Nađena je povezanost polimorfizma gena za TSH receptor i BMD vrata bedrene kosti. Osobe s TSHR-Glu(727) alelom imaju 2,3% viši BMD vrata bedrene kosti. Međutim, u istom ispitivanju nađeno je da je učinak slobodnog tiroksina na kost bio jači od učinka TSH, a također i od učinka ITM-a (173). Mazziotti i sur. našli su da je akutni porast serumskog TSH u bolesnica s karcinomom štitnjače, u kojih je primijenjen rekombinantni TSH, povezan s reverzibilnom inhibicijom koštane resorpcije. Našli su sniženje razine serumskih C-telopeptida kolagena tipa 1 (CrossLaps) i porast razine aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze u krvi. Nisu registrirali nikakav učinak na produkciju osteoprotegerina. Ovaj učinak TSH zabilježen je samo u postmenopauzalnih žena u kojih je negativni učinak tirosupresivne terapije na koštanu masu i pregradnju kosti jače izražen nego u premenopauzalnih žena (179). Također, ni Giusti i sur. nisu našli akutni utjecaj rekombinantnog TSH na razinu osteoprotegerina i RANKL-a u bolesnika s diferenciranim karcinomom štitnjače (180).

3. Kompetitivno ometanje djelovanja vitamina D na kost

Mehanizam je sljedeći:

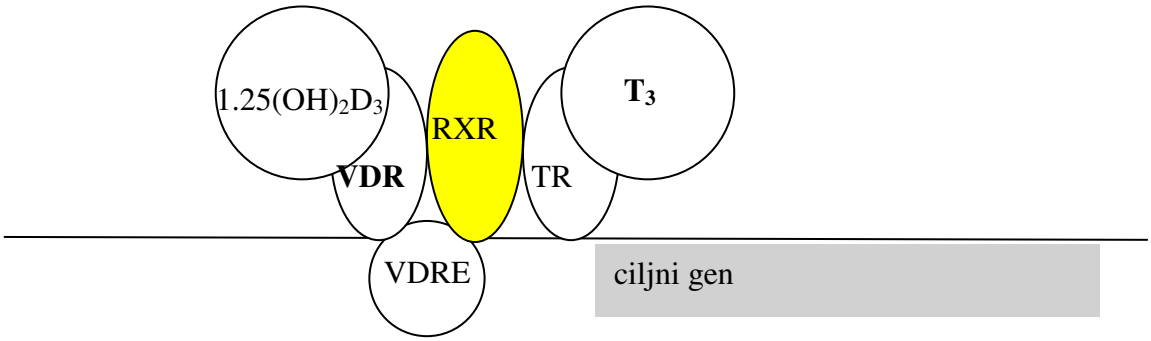
a) Kalcitriol se u citoplazmi veže za VDR nakon čega kompleks dolazi do retinoidnog X receptora (RXR) na promotor regiji ciljnog gena i s njim se veže u heterodimer koji se veže za vitamin D response element (VDRE), nakon čega slijedi daljnja aktivacija cijele promoter regije i potom transkripcije gena. (181,182).

b) Trijodtironin (T_3) se veže za TR koji se veže također za RXR formirajući heterodimer.

Vezanje VDR za RXR i s druge strane TR za RXR je kompetitivno inhibirajući proces. To može objasniti barem dijelom povezanost hipertireoze s pojačanom demineralizacijom kosti, zbog mogućeg slabijeg učinka vitamina D (Slika 2.)

Dakle, VDR i TR kompetiraju za RXR i na naj način u hipertireozi može doći do slabije aktivnosti kalcitriola, što može imati negativan učinak na očuvanje koštane mase. Isto tako, i nevezani VDR može imati represornu funkciju na transkripciju posredovanu T3 (183).

Slika 2. Hipertireoza: kompetitivno ometanje djelovanja vitamina D



1.6.1. Kinetičke studije metabolizma kalcija

Provedene kinetičke studije pokazale su negativnu ravnotežu kalcija u bolesnika s hipertireozom. Pojačana je resorpcija kalcija iz kosti. Pojačan je gubitak kalcija crijevima, kožom i urinom. Smanjena je ukupna i frakcijska količina apsorbiranog kalcija iz crijeva na 19% umjesto 30%, što se nalazi u zdravih osoba. Gubitak kalcija crijevima događa se zbog ubrzane peristaltike, što je vjerojatno posljedica direktnog učinka tiroksina i trijodtironina na crijeva, te niske razine PTH i kalcitriola. Dnevni gubitak kalcija povećan je 4 puta.

Razina biljega koštane pregradnje u plazmi i urinu pokazuje promjene. U bolesnika s hipertireozom može se naći:

1. povišena razina alkalne fosfataze (AF) i za kost specifične AF
2. hiperkalcemija
3. hiperkalciurija

4. hiperfosfaturija
5. povećana ekskrecija specifičnih biljega koštane pregradnje u urinu (184,185)
6. snižena koncentracija PTH (sekundarno)
7. snižena koncentracija kalcitriola (smanjena produkcija i ubrzana konverzija)

Metabolizam kalcija normalizira se nekoliko tjedana nakon radiojodne ili medikamentozne terapije.

1.6.2. Hipertireoza i koštana pregradnja

Bolesnici s hipertireozom godišnje gube oko 2% koštane mase. U bolesnica u premenopauzi češće se javlja osteopenija, a u postmenopauzalnoj dobi osteoporoza. Međutim, nije sigurno da hipertireoza uzrokuje češće osteoporotične prijelome kosti u postmenopauzi. Jedino se osteoporotični prijelomi događaju ranije u bolesnica s hipertireozom nego u eutireoidnih bolesnica s osteoporozom. (186). Nakon postizanja remisije bolesti koštana masa u premenopauzalnih bolesnica se nakon nekoliko godina (3 i više godina) normalizira i bez primjene antiresorptivnog liječenja, dok u bolesnica u kojih se hipertireoza javila u postmenopauzi i dalje ostaje snižena koštana masa, mada neki autori ne nalaze značajan utjecaj dobi u kojoj se javila hipertireoza na konačan dugotrajan rizik nastanka osteoporoze (187).

U hipertireozi dolazi do ubrzanja koštane pregradnje i skraćenja ciklusa koštanog remodeliranja (188). Prvenstveno se gubi koštana masa u području kortikalne kosti (distalna trećina palčane kosti i vrat bedrene kosti) (189).

Osteoklasti su osjetljiviji na porast razine hormona štitnjače od osteoblasta. Povećan je broj i aktivnost osteoklasta. Ovaj direktan učinak može se inhibirati kalcitoninom i kortizolom. Pojačana je, ali slabije i aktivnost osteoblasta. Mineralizacija je povećana 220 %, a resorpcija 265 % (190).

Poremećaji endokrine funkcije štitnjače imaju različit učinak na koštanu pregradnju i koštanu masu u različitim dobnim skupinama. U djetinjstvu na koštani sustav jače utječe hipotireoza, koja uzrokuje usporenje rasta i abnormalnosti kostiju, dok je u odraslih izraženiji utjecaj hipertireoze na kosti. Promjene koštane mase uzrokovane hipertireozom mogu biti reverzibilne i ireverzibilne. Reverzibilnost promjena ovisi o veličini remodelirajućeg prostora, a njegove varijacije ovise o:

1. frekvenciji aktivacije osteona
2. konačnoj dubini resorpcije
3. trajanju ciklusa remodeliranja

Ireverzibilne promjene nastaju kada se dogodi ruptura i dezintegracija mreže gredica (mikrofrakture koštanih gredica). Rizik mikrofraktura koštanih gredica povećan je kod:

1. povećane frekvencije aktivacije osteona
2. povećane konačne resorpcijske dubine
3. smanjene debljine koštanih gredica

U zdravih osoba, koje su eutireoidne, frekvencija aktivacije koštane strukturne jedinice, osteona iznosi 1x/2-3 godine u spongioznoj kosti, a u kortikalnoj kosti je niža. U hipertireozi:

1. raste frekvencija aktivacije osteona: 1x/1-2 godine
2. skraćeno je trajanje i resorptivne faze i faze izgradnje kosti
3. konačna dubina resorpcije je normalna
4. ali je značajno reducirana debljina trabekule
5. negativan balans: 9-10 μm /ciklus
6. «mineralization lag time» (vrijeme između formacije osteoida i naknadne mineralizacije osteoida) je skraćeno, što vodi smanjenju debljine osteoda.

1.6.3. Hipertireoza, koštana masa i lomljivost kosti

A) Kortikalna (kompaktna) kost

Kortikalna kost gubi se više od trabekularne kosti (koja je uglavnom očuvana) i to jače u postmenopauzalnom periodu i s dugotrajnijim posljedicama (191,192). Koštana masa gubi se i u djece s hipertireozom. Osteopenija se nalazi u 42% djece s hipertireozom. Gubi se pojačano i kortikalna i trabekularna kost, ali dominantno kortikalna (193). U dječjoj dobi nakon postizanja remisije hipertireoze, dolazi do brzog povećanja koštane mase, koja se već nakon godinu dana normalizira.

B) Trabekularna kost

Trabekularna kost je tek blago do umjereno smanjena u hipertireozi.

Kod primjene supresivnih doza levotiroksina nakon više godina gubi se oko 10% koštane mase. Kod supstitucijske terapije levotiroksinom, već za 1 mjesec ubrzava se resorpcija kosti, ali ukupni gubitak nije značajan.

C) Koštana pregradanja i koštana masa nakon liječenja hipertireoze

Za nekoliko tjedana normalizira se metabolizam kalcija (već za 0,5-2 mjeseca). Postupno raste koštana masa, mada se još godinama nalazi smanjena koštana masa, prvenstveno u području kortikalne kosti, ali se potpuno ili gotovo potpuno oporavi i vrati na početnu razinu od prije pojave bolesti, pa ne predstavlja čimbenik rizika za nastanak osteoporoze u postmenopauzalnom periodu, ako je remisija nastupila prije menopauze. Porast koštane mase u području slabinske kralježnice iznosi 3,7% godišnje.

D) Hipertireoza i lomljivost kosti

Nekoliko studija pokazalo je povećanje rizika prijeloma kosti u bolesnika s hipertireozom. Vestergaard i sur. našli su povećan rizik prijeloma kralježaka i podlaktice, posebno u skupini bolesnica starijih od 50 godina, odnosno u postmenopauzalnom periodu (194). Rizik prijeloma bio je povećan u bolesnica koje su primile samo radiojodnu terapiju, ali ne u bolesnica koje su uz radiojodnu terapiju primale metimazol ili drugu terapiju. U drugom velikom istraživanju Vestergaard i sur. našli su prolazno povećan rizik prijeloma bilo koje kosti tijekom 5 godina nakon postavljanja dijagnoze hipertireoze. Primjena tirostatske medikamentozne terapije značajno je smanjivala rizik prijeloma neovisno o dozi lijekova. Operacije štitnjače u liječenju hipertireoze i karcinoma štitnjače nisu bile povezane s povećanim rizikom prijeloma (195). Bauer i sur. nalaze povećan rizik prijeloma vrata bedrene kosti i kralježaka u žena starijih od 65 godina sa suprimiranim TSH, dok primjena levotiroksina ne povećava rizik prijeloma ako je TSH unutar fiziološkog raspona (168).

Interesantno je da je lomljivost kosti povećana i u bolesnika s hipotireozom, iako je koštana masa očuvana ili povećana. Povećana lomljivost kosti posljedica je negativnog učinka hipotireoze na koštanu strukturu, odnosno kvalitet kosti (193,194,196,197). Rizik prijeloma kostiju podlaktice prolazno je povećan prve dvije godine nakon postavljanja

dijagnoze hipotireoze i to u bolesnica starijih od 50 godina (198). U drugom velikom ispitivanju nađen je povećan rizik prijeloma bilo koje kosti tijekom prvih 10 godina od postavljanja dijagnoze hipotireoze (194).

1.7. Tjelesna masa, struktura tijela i kost

Dosadašnje studije pokazale su povezanost tjelesne mase s koštanom masom, a odnos je proporcionalan (199,200). Mehanizam te povezanosti je složen. Radi se o genetskim, biomehaničkim, metaboličko-endokrinološkim mehanizmima. Uočeno je da struktura tijela djeluje na koštanu masu, ali i na geometriju i strukturu kosti, pa tako i na lomljivost kosti. Ukupna tjelesna masa može se podijeliti na ukupnu masu masnog tkiva, koštanu masu i „mršavu“ tjelesnu masu (engl. lean body mass), a masno tkivo na visceralno i potkožno koja se značajno razlikuju. Masno tkivo i „mršava“ tjelesna masa sačinjavaju preko 90% ukupne tjelesne mase. Nađena je povezanost i „mršave“ tjelesne mase i mase masnog tkiva s BMD-om, a njihovi učinci na BMD, strukturu kosti, geometriju i lomljivost kosti su različiti. Do sada nije značajnije istraživan utjecaj distribucije masnog tkiva na ova svojstva kosti.

1.7.1. Utjecaj indeksa tjelesne mase na BMD u bolesnica s hipertireozom

Malo je podataka o utjecaju indeksa tjelesne mase (ITM) na BMD u bolesnica s hipertireozom, a rezultati su kontradiktorni. Duncan i sur. su našli pozitivnu korelaciju ITM-a i BMD-a slabinske kralježnice i kuka (u tri mjesta) u bolesnica s dugotrajnom tiroksinskom supresivnom terapijom i supstitucijskom l-tiroksinskom terapijom, od kojih su neke prethodno bolovale i od hipertireoze (201). Chen i sur. su također našli povezanost ITM-a i BMD-a u bolesnica koje su bile na dugotrajnoj tiroksinskoj supresivna terapiji (202). Međutim, Nuzzo i sur. nisu našli povezanost ITM-a i BMD-a u premenopauzalnih bolesnica koje su bile pod dugotrajnom tireoksinskom supresivnom terapijom (203). Također, ni

Mazokopakis i sur. u premenopauzalnih bolesnica koje su godinu dana primale tiroksinsku supresivnu terapiju nisu našli povezanost ITM-a i BMD-a, iako su registrirali smanjenje ITM-a i BMD-a tijekom terapije (204). Ni Hanna i sur. nisu našli povezanost ITM-a i BMD-a u bolesnica koje su duže od 5 godina bile na tiroksinskoj supresivnoj terapiji (205).

1.7.2. Utjecaj strukture tijela na BMD

Dob i spol modificiraju utjecaj strukture tijela na BMD (206). U "periodu linearnog rasta" do 4 godine nakon menarhe aBMD (a=areal, površinski) L1-L4 i vrata bedrene kosti rastu s godišnjim promjenama u „mršavoj" masi: 1,7 i 1,0 % /kg/god., neovisno o promjenama mase masnog tkiva ili visine. U "periodu nakon linearnog rasta" aBMD L1-L4 i vrata bedrene kosti raste s godišnjim promjenama mase masnog tkiva: 0,3 i 0,5 %/kg/god., neovisno o promjenama „mršave" mase.

U postmenopauzalnih žena bez osteoporoze ukupna „mršava" tjelesna masa je povezana s BMD-om i BMC-om (207,208,209). U žena s osteoporozom i ukupna „mršava" tjelesna masa i masa masnog tkiva, povezani su s BMD-om. U djece, adolescenata i mladih žena „mršava" tjelesna masa povezana je s BMD-om (210). U postmenopauzalnih žena masa masnog tkiva povezana je s BMD-om (211). U starijih žena masa masnog tkiva povezana je s BMD-om (212,213).

1.7.3. Povezanost tjelesne mase i strukture tijela s prijelomima

Ukupna količina masnog tkiva povezana je s prijelomima u postmenopauzalnih žena, prijelomom vrata bedrene kosti u starijih osoba, a utječe i na tip prijeloma vrata bedrene kosti (214,215,216,217). Štoviše, debljina i prekomjerna tjelesna težina povezane su s povećanim rizikom gubitka prednjih zuba u postmenopauzalnih žena, unatoč većem BMD-u (218).

Povećana „mršava" tjelesna masa i snižena masa masnog tkiva povezani su s prijelomima kralježaka u postmenopauzalnih žena pod glukokortikoidnom terapijom, dok nije nađena veza u premenopauzalnih žena pod glukokortikoidnom terapijom (219).

Povećana masa masnog tkiva i smanjena «mršava» tjelesna masa povezani su s ponavljanim prijelomima radiusa u djece i adolescenata (220).

Povećana masa masnog tkiva i snižena „mršava“ masa povezani su s nižim BMD-om distalnog dijela palčane kosti i povećanim rizikom ponavljanih prijeloma palčane kosti (Collesove frakture) (220). Djeca s prekomjernom tjelesnom težinom imaju povećan rizik prijeloma (221,222). Visoka debljina u dječaka i djevojčica povezana je s niskim BMC-om, aBMD-om (a=areal, površinski) i vBMD-om (v=volumetric, volumni) i povećanim rizikom prijeloma kostiju distalne podlaktice (223,224). Tjelesna aktivnost je povezana s porastom „mršave“ tjelesne mase i smanjenjem mase masnog tkiva, što je povezano s porastom BMD-a (225).

1.7.4. Genetska osnova povezanosti tjelesne mase i BMD-a

Tang i sur. učinili su pretraživanje genoma i našli **kromosomske regij**e koje povezuju **masu masnog tkiva i BMD (**226**).** Našli su povezanost mase masnog tkiva s BMD-om L1-L4 regije preko kromosomske regije 7p22-p21 (LOD 2,69), a s BMD-om vrata bedrene kosti preko: 7p22-p21 (LOD 2,69), 6q27 (LOD 2,30), 11q13 (LOD 2,64). Pri tome povezanost je spolno specifična. Specifično samo u muškaraca nađena je povezanost masnog tkiva s BMD-om L1-L4: 13q12 (LOD 3,23), a s BMD-om vrata bedrene kosti preko: 13q12 (LOD 3,23) i 7q21 (LOD 2,59). Specifična za žene je povezanost mase masnog tkiva i BMD-a L1-L4 preko 15q13 (LOD 3,32) i BMD-a vrata bedrene kosti preko: 15q13 (LOD 3,32) i 6p25-24 (LOD 3,15).

Nađeni su zajednički **genski polimorfizmi** koji su povezani i s masom masnog tkiva i s BMD-om. Do sada je ovakva povezanost s oba svojstva nađena u polimorfizama gena za: IL6R (masa masnog tkiva, vrat bedrene kosti), IL6 (masa masnog tkiva, vrat bedrene kosti), rezistin (mišićna snaga, volumen kortikalne kosti i fenotip masnog tkiva u muškaraca i žena), RANK (debljina, masa masnog tkiva, postotak masnog tkiva, mršava tjelesna masa, ITM, BMD), CART (masa masnog tkiva, BMD podlaktice), glukokortikoidni receptor (masa masnog tkiva, ITM, BMD) (227,228,229,230,231,232).

Sun i sur. su genomskim pretraživanjem našli veću genetsku i negenetsku povezanost **„mršave“ tjelesne mase i koštane geometrije vrata bedrene kosti** nego tjelesne težine i geometrije vrata bedrene kosti. Heretabilnost parametara geometrije vrata bedrene kosti

iznosila je 50-60%. Geometrijski parametri vrata bedrene kosti, tjelesna težina i „mršava“ tjelesna masa dijele neke zajedničke genetske i negenetske čimbenike (233). Deng i sur. proveli su pretraživanje cijelog genoma (26). Našli su povezanost ukupne „mršave“ tjelesne mase i parametara geometrije vrata bedrene kosti preko istih kromosomskih regija. Našli su povezanost ovih svojstava preko zajedničkih kromosomskih regija 3q12 i 20q13. Povezanost je bila spolno specifična: 6p25 i 10q24 u žena, a 4p15, 5q34-35 i 7q21 u muškaraca. Ispitivanje kromosoma X također je pokazalo povezanost: Xp22.13, Xp11.4, Xq22.3, Xq23-24 i Xq25. Također, kromosomske regije 5q34-35, 7q21, 10q24, 20q13, Xp22.13, Xp11.4, i Xq25 su pokazale značajnu povezanost s ovim svojstvima.

Xiong i sur. potvrdili su postojanje genetske poveznice „mršave“ tjelesne mase i geometrije vrata bedrene kosti (234). Genomskim pretraživanjem našli su genetsku povezanost ovih svojstava koja je spolno specifična. U žena ova svojstva su povezana preko kromosomskih regija: 3q12, 20q13, 6p25, 10q24, a u muškaraca preko: 4p15, 5q34-35, 7q21. Geometrija presjeka vrata bedrene kosti: nagib vrata bedrene kosti, površina presjeka, debljina korteksa i modul presjeka povezani su s kromosomskom regijom 20q12 (LOD = 3,72), a s njom je povezana i „mršava“ tjelesna masa. Također, zajednička za „mršavu“ tjelesnu masu i debljinu korteksa je kromosomska regija Xq25 (LOD = 4,28 i 3,90).

Također, nađeno je da polimorfizmi ERα u postmenopauzalnih žena modificiraju učinak mršave tjelesne mase na BMD vrata bedrene kosti, ali ne i na BMD slabinske kralježnice (235). U premenopauzalnih žena i muškaraca nije nađena ovakva interakcija.

Nađena je i genetska osnova utjecaja mišićne snage i mase na BMD (236). Druge studije su potvrdile povezanost mišićne mase i snage, kao značajnih komponenti „mršave“ tjelesne mase i BMD-a (237,238).

1.7.5. „Mršava“ tjelesna masa i BMD

“Mršava“ tjelesna masa na koštano tkivo djeluje biomehaničkim mehanizmom. Ona mehaničkim opterećenjem stimulira funkciju osteoblasta, pa tako i izgradnju koštanog tkiva. Važna komponenta „mršave“ tjelesne mase je mišićna masa. Mišićni rad i mišićna snaga, predstavljaju također, važan mehanički stimulus za izgradnji koštanog tkiva. Mišićna snaga značajno utječe na rizik pada i nastanak prijeloma, neovisno o djelovanju na koštanu masu (88,89,90,91).

Utjecaj mršave tjelesne mase na BMD vrata bedrene kosti jači je od utjecaja masnog tkiva. Mršava tjelesna masa pokazuje jaču genetsku i negenetsku korelaciju s geometrijom vrata bedrene kosti nego ukupna tjelesna masa (233).

Liu i sur. našli su da je „mršava" tjelesna masa prediktor BMD-a u premenopauzalnih žena, a ne masno tkivo (239). Wu i sur. također nalaze značajnu povezanost „mršave" tjelesne mase i koštane geometrije, koja je jače izražena u muškaraca (199). Oni su našli da su parametri koštane geometrije, koji uključuju modul presjeka kosti (section modulus) (Z) i i aksijalnu snagu površine presjeka kosti (axial strength cross-sectional area) (CSA), u osoba dobi 20-44 godine bili veći za 14% i 13% u žena s prekomjernom tjelesnom težinom i 18%, te 20% veći u muškaraca s prekomjernom tjelesnom težinom, nego u pothranjenih, a bili su prvenstveno povezani s „mršavom" tjelesnom masom ($p<0,001$). Hill i sur. su našli u Afro-Karibijskih muškaraca dobi 40-93 god. vezu „mršave" tjelesne mase i BMD-a, pri čemu je „mršava" koštana masa bila najznačajniji pojedinačni čimbenik povezan s BMD-om (240). Janicka i sur. našli su povezanost „mršave" tjelesne mase i koštane mase, dok nisu našli vezu između količine masnog tkiva i strukture kosti u adolescenata i mladih odraslih osoba (241). Pri određivanju utjecaja „mršave" tjelesne mase na BMD treba uzeti u obzir da je ona podložna dnevnim varijacima vezanim za unos tekućne i hrane, pa sva mjerenja treba učiniti u isto vrijeme i na tašte (242).

1.7.6. Masno tkivo i BMD

Masno tkivo predstavlja najveću žlijezdu u organizmu i iza jetre, drugi organ po intenzitetu metabolizma. Ono luči brojne citokine (adipokine), koji imaju autokrine i parakrine funkcije, ali i hormone leptin i adinopnektin s endokrinim funkcijama. Povećana i smanjena tjelesna masa povezane su s promjenama ukupne mase masnog tkiva, a također i s promjenama distibucije masnog tkiva. Posljedica toga su promjene funkcije masnog tkiva. Debljina je definirana indeksom tjelesne mase (ITM), većim od 30 kg/m2. Karakerizirana je pojačanim lučenjem i porastom serumske razine hormona i citokina koje luči masno tkivo: leptina, rezistina, TNF-a, IL-6, MCP-1, PAI-1 i drugih, a smanjenim lučenjem adiponektina. Utjecaj nekog hormona i adipokina na koštano tkivo najvjerojatnije nije jednak u osoba muškog i ženskog spola, osoba normalne tjelesne mase, debelih i mršavih, žena u premenopauzalnom i postmenopauzalnom periodu, osoba s komorbidnim stanjima i drugim

bolestima, kao što je hipertireoza. Međutim, o tim specifičnostima za sada još nema dovoljno podataka, osim o utjecaju spola i dobi na odnos masnog tkiva i kosti.

Masa masnog tkiva ima negativan učinak na koštanu masu u muškaraca, premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena, unatoč pozitivnom djelovanju same težine (243). Veći postotak masti u organizmu je rizik za: osteopeniju, osteoporozu i nevertebralne prijelome neovisno o tjelesnoj težini, tjelesnoj aktivnosti i dobi.

Utjecaj leptina i adinonektina, dva najznačajnija adipokina koji imaju endokrinu funkciju, na koštano tkivo, ispitivani su u in vitro i in vivo uvjetima, u životinja i ljudi, te u ljudi u različitim uvjetima. Rezultati studija s leptinom su kontradiktorni.

U više studija nije nađena korelacija razine **leptina** i koštane mase (244,245,246,247,248,249,250).

Goulding, Yamauchi, Pasco i Thomas nalaze pozitivnu korelaciju između razine leptina i BMD-a (251,252,253,254), ali drugi autori nalaze negativnu korelaciju (255,256,257,258). Blain i sur. su također našli vezu razine leptina i BMD-a vrata bedrene kosti, ali ne i slabinske kralježnice u postmenopauzalnih žena (259). Chanprasertyothin i sur. našli su da je razina leptina kojeg luče adipociti i čija razina je povišena u debelih osoba, povezana s BMD-om u muškaraca i premenopauzalnih žena, ali ne i u postmenopauzalnih žena, što sugerira mogućnost da bi leptin primarno mogao utjecati na povećavanje koštane mase rano u životu. (260). Kontogianni MD i sur. našli su pozitivnu korelaciju BMD-a slabinske kralježnice s ITM ($p=0.002$) i ukupnog BMC-a s ITM ($p<0.0001$), negativnu korelaciju BMD-a i serumske razine leptina ($p = 0.027$), ali samo kada se u korelaciju uključi i serumska razina inzulina, dok adiponektin nije korelirao ni s BMD-om (L2-L4) niti s ukupnim BMC-om u perimenopauzalnih žena (261).

In vitro studije su pokazale da leptin stimulira diferencijaciju osteoblasta (262,263), a inhibira osteoklaste i resorpciju kosti (264,265,266).

U ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama leptin pokazuje inhibitoran učinak na formiranje nove kosti hipotalamičkim mehanizmom (267). Leptin regulira koštanu pregradnju djelujući na osteoblaste preko 2 različita neuralna puta: preko simpatikusa i CART-a (268). Pokazalo se da je simpatički nervni sustav periferni medijator leptinskog djelovanja na kost (269).

Adiponektin je drugi adipokin čija je veza s BMD-om ispitivana, a s konzistentnijim rezultatima nego što je to slučaj s leptinom. Richards i sur. našli su da se s porastom ITM-a u debelih smanjuje razina adiponektina u krvi, a raste BMD i osteokalcin i obrnuto, smanjenjem ITM-a raste razina adiponektina i smanjuje se BMD i razina osteokalcina (270).

Jürimäe i sur. su našli negativnu povezanost razine adiponektina i ukupnog BMD-a (p = 0.004) i BMD-a slabinske kralježnice (p = 0.005) u premenopauzalnih žena (271). Luo i sur. su našli da adiponektin povećava formiranje osteoklasta indirektno kroz stimulaciju RANKL i inhibiciju produkcije OPG u osteoblastima (272).

Oh i sur. su ispitali povezanost više serumskih adipokina na koštanu masu u muškaraca. Našli su samo negativnu vezu razine serumskog rezistina i BMD-a slabinske kralježnice (r = -0.237, P = 0.05), dok nije nađena značajna korelacija leptina, adiponektina i ghrelina s BMD-om (273).

Nema podataka o utjecaju tjelesne mase i strukture tijela na BMD u bolesnica s hipertireozom.

1.8. Genetika osteoporoze

Studije na blizancima i obiteljske studije provedene unatrag 30 godina pokazale su povezanost genetskih čimbenika i BMD-a (1,2,3,4,5). Osteoporoza nije posljedica mutacije jednog gena, osim u izuzetnim slučajevima kao u bolesnika s osteoporoza-pseudoglioma sindromom gdje se nalazi mutacija LRP5 gena (engl. low-density lipoprotein receptor-related protein 5 = protein povezan s receptorom za lipoproteine niske gustoće) (274). Osteoporoza je multifaktorijalna i poligenetska bolest. U genetskoj osnovi poligenetskih bolesti su genski polimorfizmi: SNP-ovi (engl. single nucleotide polymorphism = polimorfizam jednog nukleotida), rjeđe polimorfizmi uključeni u male blokove kao mikrosateliti (1-4 para baza koji se ponavljaju 2-10 puta) i minisateliti (ponavljanje 20-500 parova baza). U osnovi sveukupne raznolikosti živih bića su polimorfizmi, koji su zasnovani na uzajamnom odnosu genskih polimorfizama i epigenetskih utjecaja iz okoline. Genski polimorfizmi su definirani kao zajedničko pojavljivanje u istom staništu dvije ili više diskontinuiranih formi, ili «faza», vrste u takvom omjeru da najrjeđe od njih ne bi mogle biti održane samo ponavljanjem mutacija (275). Definicija polimorfizma je da je to uočljiva varijanta molekule ili gena koja se događa u više od 1% populacije. Ako je frekvencija varijacije manja od 1% radi se o

mutaciji (276). Izvor ovih polimorfizama mogu biti mutacije gena, rekombinacije i ubacivanje gena iz vana. Ubacivanje gena iz vana u genom domaćina je jedna od vjerojatnih mogućnosti, a radi se o ubacivanju genoma virusa. Po endogenizacijsko-degeneracijskoj hipotezi vjerojatnije je da su bar neki ERV (retrovirusi) bili inkorporirani u početni dizajn eukariotskih oblika života nego da su bili dodani tijekom evolucije slučajnom endogenizacijom egzogenih infektivnih agensa. ERV-ovi s fiksiranom kromosomskom pozicijom su vjerovatnije integralni djelovi genoma domaćina koji su kreirani u domaćinu, dok bi ERV-ovi sa pozicijskim polimorfizmima mogli biti kopije egzogenih virusa. Degenerativna priroda spriječava evoluciju ERV-ova u infektivne viruse.

SNP-ovi utječu na veliku šarolikost fiziološke varijabilnosti različitih svojstava. Ispitivanjem genoma nađeno je preko 1.420.000 SNP-ova (277). Jedan SNP se pojavljuje nakon prosječno svakih 1000 baza. U bolestima s poligenetskom osnovom jedan SNP najčešće nije povezan sa značajnim rizikom pojave bolesti, nego sa blagom sklonošću detektabilnom tek statističkim metodama analize, koja se u slučaju osteoporoze svodi na vrlo skroman utjecaj na koštanu masu ili lomljivost kosti. Procjenjuje se da 1 SNP utječe na samo 0.2-0.5% (najviše do 2%) BMD-a (34*).*

Ispitivanje povezanosti **genskih polimorfizama** i **BMD**-a, odnosno rizika nastanka osteoporoze, te osteoporotičnih prijeloma počinje 1994. godine. Prvi objavljeni rad u kojem je ispitivan odnos polimorfizma nekog gena i koštane gustoće bilo je ispitivanje Morrisona i sur. u kojem su objavili rezultate ispitivanja odnosa polimorfizma gena za receptor vitamina D (VDR) i koštane gustoće (278). Rad je objavljen u Nature-u i pokazao je izuzetno veliku povezanost polimorfizma VDR gena i BMD-a. Međutim, kasnije su isti autori objavili ispravak rezultata kao posljedicu ozbiljnih grešaka učinjenih u genotipiziranju, tako da su rezultati znatno ublaženi, a ustanovljena veza bila je blaga. Već pola godine nakon prvog objavljenog rada u kojem je ispitivan odnos polimorfizma gena za VDR i BMD-a, objavljen je i drugi članak u kojem je ispitivan odnos polimorfizma gena za VDR i BMD-a u kojem nije nađena povezanost BMD-a i polimorfizama VDR gena, nakon čega se broj ispitivanja iz godine u godinu progresivno povećavao, s kontradiktornim rezultatima (279). U naredne 2 godine objavljeno je još 17 radova u kojima je omjer radova u kojima je nađena povezanost polimorfizama VDR gena i BMD-a u odnosu na one u kojima nije nađena ovakva povezanost 9:8, nakon čega se broj sličnih ispitivanja svake godine povećavao, a do danas nije sa sigurnošću razrješena dilema postoji li utjecaj polimrofizama VDR na BMD. Do sada je najčešće ispitivan odnos polimorfizama gena za VDR, ER i COLIA1 i BMD-a, odnosno rizika za osteoporozu. Prvi rad u kojem je ispitivan odnos ER i BMD-a je rad Sano-a i sur. iz

1995, god, u kojem nije nađena povezanost ova 2 parametra (280). Prvo ispitvanje odnosa polimorfizma gena za COLIA1 i BMD-a učinili su Grant i sur 1996. god. Oni su našli povezanost polimorfizma Sp1 veznog mjesta gena za COL1AI i osteoporoze (281).

Pregledom literaturnih navoda, zaključno do rujna 2007. godine ispitivani su polimorfizmi 100 gena. To su geni za: VDR, ER, COL1A1, COL1A2, MTHFR, MTRR, laktozu, IL-1, IL-1R, IL-6, IL-10, TNFα, TNFR2, TGFβ1, pre-pro NPY, ApoE 4, hormon rasta, receptor hormona rasta, IGF-1, LRP5, LRP6, aromatazu, SHBG, leptin, leptinski receptor, CYP1A1, CYP1B1, CYP17, CYP 19, COMT, TNFRSF1/B, matriks metaloproteinazu, BMP2, BMP4, α2-HS glikoprotein, androgeni receptor, kalcitonin, kalcitonin receptor, dopaminski receptor D4, paraoksonazu 1 i 2, PTH, PTHR, kalcij senzing receptor, RIL, IL1R antagonist, SOST, RUNX2/CBFA1, glukokortikoidni receptor, receptor CC hemokina, matriks GLA protein, ACE1, PPARγ, PPARGC1, kloto, β3-adrenergički receptor, CCR3, MCP1, MCP2, Wernerovu helikazu, DLX 6, DBP, kolagenazu, prokolagen tip 1, osteokalcin, osteopontin, FOXC2, perilipin, FR2B, osteoprotegerin, promoter regiju gena za RANKL, sintetazu NO, CbR2, promoter regiju gena za OSCAR, urokinazu, POMC, alkalnu fosfatazu, lipooksigenazu, ALOX 12, ALOX 15, ANKH, fosfodiesterazu, Sema 7a, AHSG, R12, RIZ, CLCN7, DRD4, ALDH2, CD38, PLOD1, PAI-1, CALM2, QPCT, ROR2, KIT, farnezil difosfat sintaza, katalaza, GGCX, TNSF11.

Za većinu ovih gena i njihovih polimorfizama učinjeno je jedno ili tek nekoliko ispitivanja. Samo manji broj gena ispitivan je u većem broju ispitivanja ili na većem uzorku ispitanika, a najčešće su ispitivani polimorfizmi gena za VDR, ER i COL1AI. Nakon početnih pozitivnih rezultata slijedili su brojni kontradiktorni rezultati ispitivanja odnosa polimorfizama najčešće ispitivanih gena, gena za VDR, COL1A1 i ER i BMD-a, a niti meta-analize nisu potpuno razrješile dilemu povezanosti polimorfizama ovih gena i navedenih svojstava. Razlozi kontradiktornosti ovih rezultata su višestruki.

1. **Razlike u dizajnu studija.** Studije se razlikuju po dobi i spolu ispitanika, vrsti osteoporoze, vrsti denzitometra, načinu izvođenja genetskih analiza, izboru mjesta prijeloma, načina dobivanja podataka o prijelomima – od anketa, anamneze, radioloških pretraga do medicinske dokumentacije i dr.

2. **Mali broj ispitanika**. Utjecaj jednog SNP-a na koštanu masu i rizik nastanka osteoporoze, odnosno prijeloma, vrlo je slab. Procjenjuje se da 1 SNP utječe na samo 0.2-0.5%, najviše do 2% koštane mase, zbog čega su potrebne velike skupine ispitanika da bi rezultati imali dovoljnu statističku snagu. Procjenjuje se da je potrebno preko 10.000 ispitanika za adekvatnu snagu analize u prisustvu genuine genetske heterogenosti (282).

3. Primjena **različitih statističkih metoda**. Kannus i suradnici u velikoj prospektivnosj studiji blizanaca nisu našli povezanost genetskih čimbenika sa sklonošću osteoporotičnim prijelomima, dok su korištenjem istih podataka, primjenom druge statističke metode MacGregor i suradnici našli značajnu povezanost (64,53).

4. **Pogreške u radu**. Poznat je slučaj iz prve studije u kojoj je ispitivana povezanost polimorfizma gena za VDR i koštane mase u kojoj su dobiveni pogrešni rezultati zbog pogreške u izvođenju genetskih analiza (278). što je imalo utjecaja i na daljnje studije. Osim grešaka pri genotipizaciji, moguće su i greške pri denzitometrijskom mjerenju BMD-a.

5. Meta-analize su također, dale kontradiktorne rezultate. Razlozi su brojni: razlike u dizajnu i kvaliteti odabranih studija, insuficijentna korekcija iskrivljenja, **publikacijsko „iskrivljenje“** (publikacijska pristranost, engl. publication bias) i preuski intervali sigurnosti (engl. confidence intervals) (283,284,285). Ioanidis i suradnici su analizom 55 meta-analiza (579 studija) našli da je samo oko 16% identificiranih genetskih povezanosti kasnije bilo ponovno nađeno sa statističkom značajnošću, bez heterogenosti ili „iskrivljenja“ (engl. bias) (282). Publikacijsko iskrivljenje je osobito važan uzrok različitosti, odnosno kontradiktornosti rezultata meta-analiza (286). Ono predstavlja posljedicu utjecaja različitih čimbenika koji modificiraju vjerojatnost da studija bude uključena u meta-analizu. Studije u kojima su nađeni statistički značajni rezultati (**„efekt pozitivnih rezultata“**) značajno češće se publiciraju i češće objavljuju u časopisima s visokim citacijskim faktorom utjecaja („impact factor“**)** nego studije u kojima nisu nađene razlike između ispitivanih grupa (287,288,289). Poznat je i **„efekt malih studija“,** koji najčešće uzrokuje publikacijsko iskrivljenje (mada to nije uvijek nužno). Efekt malih studija je termin kojim se označava tendencija malih studija u meta analizama da pokažu veći učinak ili povezanost ispitivanih svojstava od velikih studija (290). Male studije pokazuju veću statističku značajnost dobivenih rezultata od velikih studija. U velike studije se ulaže veći novac, vrijeme i trud, pa se očekuje i veći metodološki kvalitet ovih studija i veća je vjerojatnost objavljivanja njihovih rezultata u slučaju da su negativni, što znači da će u slučaju negativnih rezultata veća šansa za objavljivanje biti ako se radi o velikim studijama. Rezultati malih studija se općenito rjeđe objavljuju, a veća šansa za objavljivanje je ako su rezultati „pozitivni“. Pri izboru studija za meta-analizu uzimaju se rezultati studija koje su objavljene a ne i neobjavljenih studija. Veća vjerojatnost je da se uzmu u obzir studije u časopisima s većim impakt faktorom, a za to je veća šansa velikih studija. To uzrokuje publikacijsko iskrivljenje koje utječe na rezultate meta analiza. Ovo iskrivljenje može se razotkriti i prikazati grafički, a može se statističkim metodama procijenti i veličina iskrivljenja. Grafički se rezultatai studija

različite veličine distribuiraju simetrično. U slučaju iskrivljenja dolazi do asimetrične distribucije (zbog neobjavljivanja rezultata malih studija, ili pak zbog pogrešaka nastalih pri izvođenju malih studija), mada ona može biti asimetrična i zbog genuine heterogenosti studija, ali i zbog drugih razloga (npr. moguće je da je u maloj studiji ispitivano svojstvo specifično povezano s drugim svojstvom dok u velikoj studiji nije bilo moguće sakupiti tako veliki broj osoba s tim specifičnim svojstvom pa se u heterogenosti velike studije oslabio ili „izgubio“ ovaj specifičan učinak nekog specifičnog svojstva na ukupne rezultate studije, a jače naglašen pozitivan rezultat u maloj studiji u tom slučaju je bliži realnom stanju). Razvijeni su različiti statistički testovi za procjenu postojanja i veličine ovog učinka malih studija na rezultate meta-analize. Možda najbolje rezultate u praksi daje regresijska metoda. Sterne i suradnici su u svojoj velikoj meta-analizi našli da je efekt malih studija prisutan u 26.9% meta-analiza. Male studije tendiraju da pokažu statistički jaču povezanost ispitivanih svojstava u 69% meta-analiza. Nekritičko kombiniranje samo objavljenih studija može voditi preoptimističnim zaključcima. Meta-analize (**MPL** engl. meta-analyses of published literature = meta-analize objavljene literature) su donedavno koristile isključivo rezultate iz već objavljene literature. Ovaj način izvođenja meta-analiza ima svoje nedostatke: varijabilnost dizajna studija, slab kvalitet podataka, pristranosti koje se događaju zbog utjecaja takozvanog prvog rezultata, utjecaja „pozitivnih“ rezultata na publiciranje, imena autora, važnosti časopisa i sl. (291).

Sličan problem je i s preglednim (engl. review) člancima, čije rezultate također treba interpretirati s oprezom. Također, uočena je i pristranost zasnovana na jeziku na kojem je studija objavljena, jer se o obzir za meta-analize uzimaju samo studije objavljene na engleskom jeziku (292), kao i utjecaj časopisa u kojima su studije objavljene (za meta-analize koriste se samo časopisi indeksirani u medline-u (293).

6. Jedno od ključnih pitanja je odabir **fenotipa** i njegova definiranost. Uglavnom se rezultati genetskih analiza koreliraju s rezultatima denzitometrijskog mjerenja BMD-a i rjeđe broja prijeloma. Osim denzitometrijski BMD je određivan i qCT i ultrazvučnom metodom i to na različitim dijelovima skeleta. Koriste se denzitometri različitih firmi, koji imaju različite referentne vrijednosti i daju različite rezultate, što utječe na slabu definiranost fenotipa. Korištenje cross-calibracijske krivulje sa standardnim normativima omogućuje smanjenje varijacije rezultata između različitih denzitometara i da Z-score koji je povezan s dobi, bude korišten kao uključujući kriterij u velike multicentrične genetske studije (294). Pri tome je važno napomenuti da je denzitometrijsko mjerenje BMD-a neprecizno. Preciznost stare generacije aparata iznosila je oko 2%, a novi aparati imaju grešku oko 1%, a tome treba

pribrojati još i greške operatera. Procjenjuje se da je utjecaj jednog genskog polimorfizma na BMD vrlo skroman, svega 0.2-0.5%, maksimalno do 2%. Znači da je veća nepreciznost aparata, odnosno greška mjerenja, od veličine promjene BMD-a koju aparat treba sa sigurnošću registrirati. S druge strane, kada govorimo o osteoporozi i lomljivosti kosti u osteoporozi, nije samo BMD važan. Fenotip je slabo definiran, ne samo kada se radi o BMD-u, nego o lomljivosti, pa se zbog toga mogu očekivati i nepredvidivi rezultati jer nisu uzeti u obzir svi parametri lomljivosti osteoporotične kosti. U osnovi problema povećane lomljivosti osteoporotične kosti je s jedne strane koštana masa izražena preko BMD-a, a s druge strane niz parametara koji su obuhvaćeni terminom kvalitete kosti, od kojih se ni jedan danas još ne može mjeriti u praktičnom radu, osim biljega koštane pregradnje, dakle niti u kliničkim studijama. Pristupi sakupljanju podataka o broju prijeloma u studijama značajno se razlikuju: od korisštenja anamnestičkih podataka o zadobivenim prijelomima, smanjenju tjelesne visine i pogrbljenosti, mjerenja tjelesne visine, preko radiološkog određivanja prijeloma kralježaka, do korištenja medicinske dokumentacije o prijelomima. Kod korištenja radioloških kriterija za definiranje deformiteta kralježaka koji su analog kompresivnim frakturama trupova kralježaka, koriste se različite metode. Različiti su i uključni odnosno isključni kriteriji pri odabiru ispitanika. Neki autori isključuju prijelome koji su se dogodili prije 18. godine, drugi prije 20. godine, treći prije menopauze. Neki uzimaju u obzir samo vertebralne prijelome, drugi prijelome kuka, treći nevertebralne, četvrti sve prijelome (a opet se razlikuju u načinu dokazivanja i određivanja prijeloma).

7. Neki polimorfizmi su funkcionalni, dok su drugi **afunkcionalni,** a afunkcionalni mogu biti takvi da ne uzrokuju promjene u strukturi proteina ili da uzrokuju promjene strukutre proteina ali koje ne uzrokuju i promjene funkcije proteina. Ne moraju ni svi funkcionalni polimorfizmi biti klinički zamjetljivi i mjerljivi.

8. Utjecaj gena na BMD i lomljivost kosti nije jednostavan. Često se ne uzimaju u obzir moguće **interakcije gena**, što nerijetko nije ni moguće uzeti u obzir je nisu poznati ni svi polimorfizmi koje bi trebalo uzeti u obzir, a još manje međusobne interakcije gena i značaja polimorfizama u tome. Naročito je složeno djelovanje kalcitriola, najaktivnijeg oblika vitamina D, koji djeluje preko vitamin D receptora (VDR) koji se nalazi između ostaloga i u promoter regiji gena za PTH i gena za osteokalcin, koji su važni u regulaciji metabolizma kalcija i pregradnje kosti. Na taj način kalcitriol djeluje na razinu PTH i osteokalcina. Sam gen za VDR nalazi se na posebnom kromosomu, i njegovi polimorfizmi mogu utjecati na razinu PTH i osteokalcina, što govori za međusobni utjecaj gena koji su na

različitim kromosomima (295). Vrlo rijetko se rade haplotipske analize koje i kada se rade, obuhvaćaju samo nekoliko gena.

Za sigurno utvrđivanje povezanosti 1 SNP-a i nekog od navedenih svojstava pri izvođenju meta-analiza potrebna je:

1. velika skupina ispitanika (više od 10.000 ispitanika) koja bi dala statističku snagu dobivenim rezultatima
2. metodološki apsolutna ujednačenost studija uključenih u meta-analize
3. dobar dizajn studija
4. za smanjenje utjecaja publikacijskog "iskrivljenja" preporučljivo bi bilo formirati registre kliničkih studija (286)
5. i najvažnije, dobro definirati problem, odnosno u ovom slučaju fenotip.

Zadnjih godina u Europi su provedene 3 velike meta-analize u skladu s navedenim kriterijima, a s kontrolom i korekcijom rezultata iz jednog centra. Naime, gotovo je neizvediva jedna velika studija koja bi uključivala 20.000 i više ispitanika. Zato se rezultati više većih ispitivanja objedinjuju, ali pristup ovakvoj meta-analizi sada je aktivan. Unatrag 10-tak godina provode se takozvane **MIPD** (engl. meta-analyses of individual participant's data = meta-analize individualnih podataka učesnika) koje daju pouzdanije rezultate od **MPL** (296,297). Od autora studija traže se svi individualni podaci o svim ispitanicima, a ne skupni, gotovi, već obrađeni podaci, da bi se eventualno izvršile korekcije u slučaju pogrešaka. Također, vrše se provjere rezultata, a u slučaju prevelikog i prečestog odstupanja izvode se dodatna ispitivanja. Ako su rezultati dobiveni na različitim aparatima (ovo se odnosi prvenstveno na denzitometre) vrše se korekcije rezultata, da bi rezultati bili komparabilni. U ovakve meta-analize mogu se uključiti i rezultati neobjavljenih studija, čime se korigira učinak prvog rezultata i „pozitivnih" rezultata koji uzrokuju neobjavljivanje nekih rezultata i time deformiraju rezultate meta-analiza. Međutim, pronalaženje neobjavljenih studija je mnogo teže, pa vjerojatnost da sve budu pronađene nije velika. Nedostatak i ovih velikih proaktivnih meta-analiza je što nisu prospektivne i metodološki potpuno ujednačene, pa u sebi sadrže greške i nedorečenosti ili kontradiktornosti studija koje obuhvaćaju, što umanjuje snagu i sigurnost rezulta čak i ovako velikih i dobro organiziranih studija. S druge strane, osnovni problem, a to je dobro definiran fenotip, i dalje ostaje. Kao posljedica nejasnoća vezanih za definiciju osteoporoze i preciznog mjerenja svih relevantnih parametara, ostaju i nekonzistentnosti dobivenih rezultata u različitim studijama, pa tako i u meta-analizama dobivenim iz ovakvih studija.

Većina dosadašnjih genetskih studija osteoporoze učinjena je u žena u postmenopauzalnom periodu, a dobiveni podaci najčešće su kontradiktorni.

Pre- i postmenopauzalni period se značajno razlikuju, kao što postoje razlike između žena i muškaraca. U različitim okolnostima genski polimorfizmi mogu se manifestirati različitom jačinom, što se vidi i u bolesnika sa sekundarnom osteoporozom.

Pretraživanjem na medline-u za period od 1994. godine do 12.10.2006. godine našao sam 731 članak u kojima je ispitivan odnos 91 gena i BMD-a, a do 1.9.2007. godine ispitan je odnos polimorfizama 100 gena i BMD-a. Odnos BMD-a i VDR gena ispitivan je u 286 članaka, ER u 145 članaka i COL1AI u 87 članaka. Učinio sam analizu rezultata objavljenih čalanaka. U obzir sam uzeo 280 članaka u kojima je u sažetku naveden broj ispitanika i rezultati.

Rezultati ispitivanja odnosa BMD-a i polimorfizama ova 3 gena prikazani su u tablici 2. Uočljivo je da su studije za VDR gen i COL1AI gen koje su bile „pozitivne“ bile 2,5-3x veće po broju ispitanika nego „negativne“ studije, dok za ER nije bilo značajne razlike u veličini studija između „pozitivnih“ i „negativnih“ studija (Slika 3 i 4.). Najveće su bile studije u kojima je ispitivan utjecaj COL1AI na BMD, koje su imale prosječno 481.6 ispitanika po studiji. Iako se ne radi o meta-analizi, nego samo o jednostavnom pobrojavanju studija s pozitivnim i negativnim rezultatima, ipak je zanimljivo vidjeti kakav je omjer tih rezultata. Najuvjerljivije za postojanje povezanosti nekog od ova tri gena i BMD-a govore studije za ER. U 75.55 % studija u kojima je ispitivan ER gen nađena je povezanost polimorfizma ER gena s BMD-om. Pri tome treba istaći i malu razliku u veličini studija s pozitivnim i negativnim rezultatima, što govori protiv većeg utjecaja publikacijskog iskrivljenja pri objavljivanju ovih studija. Na drugom mjestu po konzistentnosti rezultata su studije u kojima je ispitivan odnos polimorfizama COL1AI gena i BMD-a. U 67.31% studija nađena je veza polimorfizma COL1AI gena i BMD-a. Pri tome, treba uzeti u obzir veliku razliku u veličinama objavljenih studija između „pozitivnih“ i „negativnih“, što bi moglo upućivati na utjecaj tzv. „efekta pozitivnih studija“. Treba imati u vidu i da se vezom polimorfizma COL1AI gena i BMD-a najviše bavio S. Ralston, jedan od vodećih autoriteta u području genetike osteoporoze, čiji rezultati su pokazali povezanost polimorfizma ovog gena i BMD-a te rizika prijeloma, što bi moglo utjecati i na odlučivanje urednika pri izboru članaka za objavljivanje, sa sklonošću objavljivanja studija s „pozitinim“ rezultatima. Nije mi poznato koliko je neobjavljenih studija, ali se može pretpostaviti da je veći broj prvenstveno malih studija s negativnim rezultatima među neobjavljenim studijama, što bi moglo utjecati na ukupan rezultat. Ipak, iza ovih rezultata stoje najveće studije, s najvećim brojem

ispitanika, što ima daje veću statističku snagu nego studijama s druga dva gena. Na trećem mjestu po uvjerljivosti postojanja veze s BMD-om je gen za VDR. U samo 58% studija nađena je povezanost s BMD-om, dok u 42% studija veza nije nađena. I u ovom slučaju uočljiva je razlika između veličine studija s „pozitivnim“ i „negativnim“ rezultatima, što bi moglo biti posljedica „učinka pozitivnih studija“ i „publikacijskog iskrivljenja“, te može upućivati na značajan broj neobjavljenih „negativnih“ malih studija, čije bi objavljivanje moglo značajno promijeniti omjer pozitivnih i negativnih studija.

Ovi rezultati ukazuju na moguću povezanost polimorfizama ER i COL1A1 gena i BMD-a, mada nalazi nisu konzistentni i ova veza nije sigurna, a najmanje je sigurna povezanost polimorfizama VDR gena i BMD-a u postmenopauzalnih eutireoidnih žena.

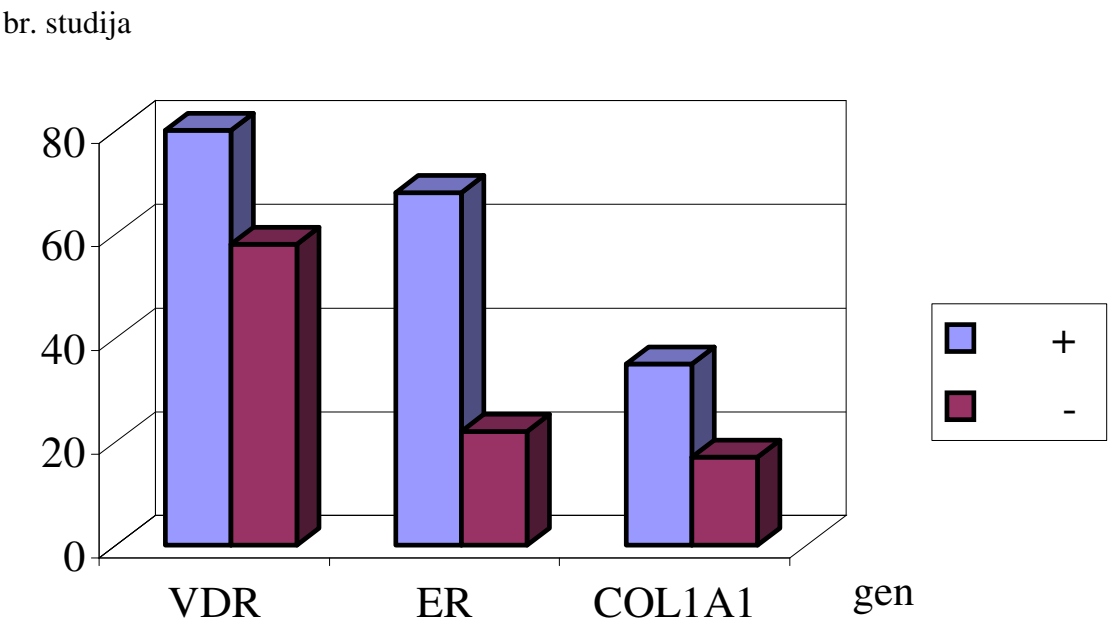
Zbog kontradiktornosti rezultata, unatoč progresivnom rastu broja studija, učinjeno je više meta-analiza.

Tablica 2. Članci objavljeni od 1994. do 12.10.2006. god.: rezultati ispitivanja odnosa BMD-a i polimorfizama gena za VDR, ER i COL1AI

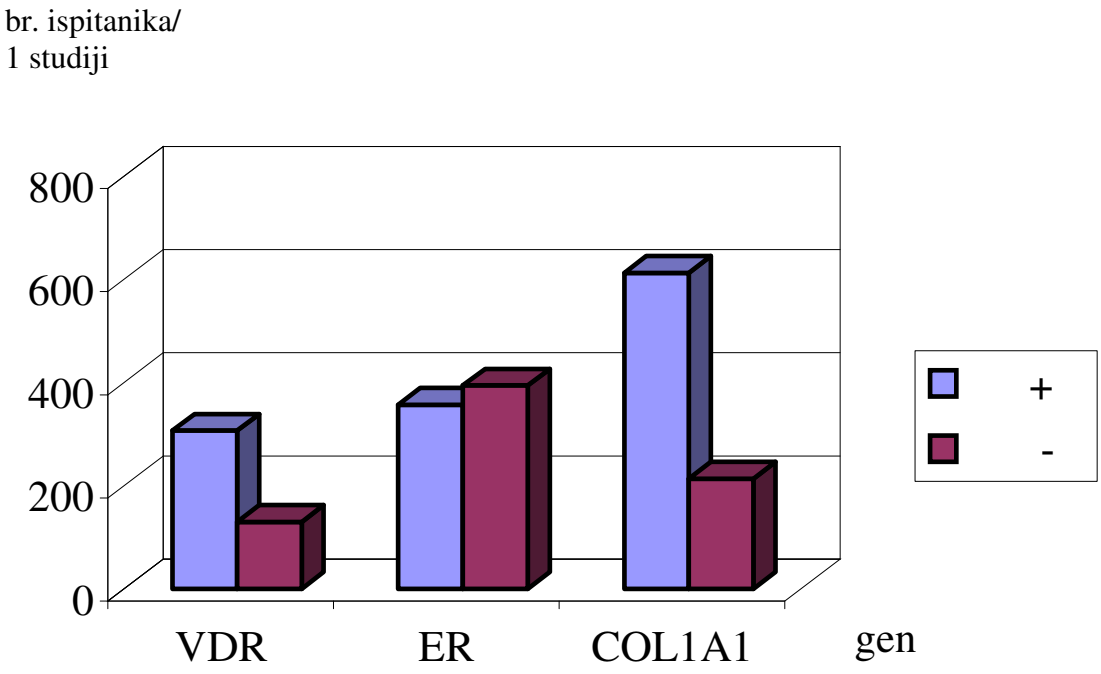
	VDR		ER		COL1AI	
Povezanost	br. radova	br. ispitanika	br. radova	br. ispitanika	br. radova	br. ispitanika
Nađena	80 58%	24.5 306,4/1isp.	68 75,55%	24.2 356,2/1isp.	35 67.31%	21.4 611,8/1isp.
Nije nađena	58 42%	17.5 129,5/1isp.	22 24,44%	8.6 393,1/1isp.	17 32.69%	3.6 213,4/1isp.
UKUPNO	138	42.0 233,7/1isp.	90	32.9 365,2/1isp.	52	25.0 481,6/1isp.

isp. = ispitanik

Slika 3. Omjer broja radova s „pozitivnim" i „negativnim" ishodom analize povezanosti genskih polimorfizama i BMD-a objavljenih od 1994. do 12.10.2006. godine



Slika 4. Prosječan broj ispitanika po jednom ispitivanju u periodu od 1994. godine do 12.10.2006. godine



1.8.1. Meta-analize polimorfizama VDR gena i BMD-a

Cooper i sur. analizirali su u meta-analizi učinjenoj 1996.godine odnos polimorfizma **BsmI** VDR gena i BMD-a. (298). Našli su niži BMD u vratu bedrene kosti u BB genotipa nego u bb ($p<0,032$), sa slabom tendencijom da taj učinak bude jače izražen u mladih osoba ($p<0,06$). Za kralježnicu i radius nije nađena povezanost ($p<0,062$ i $p<0,078$).

Gong i sur. učinili su meta-analizu 1999.godine (299). Njihov zaključak je da se s visokom razinom sigurnosti može zaključiti da je BMD povezan s genskim polimorfizmima VDR gena, i da negenetski čimbenici i genetska heterogenost interferiraju s detekcijom učinaka polimorfizama gena za VDR na koštani fenotip. Našli su da su „pozitivni" rezultati bili češći u premenopauzalnih žena nego u postmenopauzalnih ($p<0,02$), ili kombinirano u muškaraca i žena ($p<0,05$).

Thakkinstian, Eisman i sur. analizirali su u meta-analizi učinjenoj 2004.godine odnos polimorfizama VDR gena i BMD-a. (300). Našli su povezanost **BsmI** polimorfizma gena za VDR i BMD-a. BB genotip je bio povezan sa smanjenim BMD-om u kralježnici (oko 2,4%) u postmenopauzalnih žena. Procijenjeno je da je BB genotip u vezi s oko 2% prijeloma kralježaka u populaciji. Nije nađena povezanost BsmI i BMD-a kralježnice u premenopauzalnih žena. Nije nađena povezanost BsmI i BMD-a u području vrata bedrene kosti ni u premenopauzalnih ni u postmenopauzalnih žena.

Thakkinstian i sur. učinili su meta-analizu **haplotipova** polimorfizama VDR gena 2004. godine odnos polimorfizama VDR gena i BMD-a (301). Ispitali su odnos BMD-a i **BsmI, ApaI, TaqI** polimorfizama. Nijedan pojedinačno nije bio povezan s BMD-om, ali su haplotipovi Bat i BAt bili povezani s osteoporozom.

Fang i sur. analizirali su u meta-analizi učinjenoj 2006. godine odnos polimorfizama **BsmI i TaqI** VDR gena i rizika prijeloma (302). Nije nađena povezanost s rizikom prijeloma.

Zintzaras i sur. analizirali su u meta-analizi učinjenoj 2006. godine odnos BMD-a i polimorfizama VDR gena**: BsmI, TaqI, ApaI i FokI** (303). Nisu našli povezanost polimorfizama VDR gena i BMD-a.

Do sada najveća meta-analiza u kojoj je ispitivana povezanost **VDR** gena i osteoporoze, odnosno rizika prijeloma, učinjena je 2006. godine, u sklopu **GENOMOS** projekta (71). Ona je obuhvatila 9 Europskih timova s 26.242 ispitanika, od kojih su 18.495 bile žene. Nije nađena povezanost **FokI, BsmI, ApaI, TaqI i Cdx2** polimorfizama s BMD-om u području slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti, kao niti s prijelomima kosti. U

muškaraca nije nađena povezanost ni s prijelomima, dok je u žena nađena moguća veza **Cdx2** alela VDR gena i prijeloma kralježaka, neovisna o BMD-u. Nije učinjena posebna analiza podataka u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena. Cdx2 polimorfizam je funkcionalan i utječe na vezanje proteina za DNA i gensku transkripciju, što rezultira slabijom ekspresijom VDR u ciljnim stanicama za vitamin D (304).

1.8.2. Meta-analize polimorfizama COL1A1 gena i BMD-a

Efstathiadou, Tsatsoulis i **Ioannidis** učinili su 2001. godine meta-analizu u kojoj su našli povezanost **Sp1** polimorfizma gena za COL1A1 i prijeloma (305). Naglašena je moguća važnost razjašnjenja potencijalne heterogenosti kroz etničke grupe, dobne skupine i mjesta skeleta u budućim studijama i potrebe za budućim vrlo velikim studijama ili meta-analizama.

Mann i Ralston učinili su 2003. god. meta-analizu u kojoj su analizirali odnos polimorfizma **Sp1 COL1AI** gena i BMD-a, te prijeloma (306). Analizom 26 studija i 7849 ispitanika nađen je značajno niži BMD slabinske kralježnice u osoba s Ss genotipom nego u SS genotipa ($p<0,00005$), ali ne i u odnosu na ss genotip ($p=0,13$). U području vrata bedrene kosti BMD je bio značajno niži u osoba s Ss genotipom ($p<0,00001$) i ss genotipom ($p=0,001$). Nađen je umjereno smanjen BMD i značajno veći rizik osteoporotičnih prijeloma u osoba sa Ss genotipom ($p<0,002$) i ss genotipom ($p<0,0003$), naročito vertebralnih ($p<0,004$ i $p<0,00001$).

U okviru **GENOMOS** projekta učinjena je 2006.god. i velika meta-analiza u kojoj je ispitan utjecaj **COL1A1 Sp1** polimorfizma na osteoporozu i prijelome (34). U meta-analizu je bilo uključeno 20.786 ispitanika iz 9 Europskih centara. Nađena je povezanost COL1AI polimorfizma i BMD-a u području slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti i u žena i u muškaraca. Nije nađena povezanost sa svim prijelomima. Nađena je samo blaga povezanost (slabija nego u ranijim studijama i meta-analizi) s incidentalnim prijelomima kralježaka u žena i moguće u muškaraca (ovaj polimorfizam je povezan s približno 10% incidentalnih prijeloma u žena). Nije ispitivan posebno utjecaj pre- i postmenopauzalnog perioda na BMD i prijelome. COL1AI Sp1 je funkcionali polimorfizam koji utječe na vezanje proteina za DNA, regulaciju gena za kolagen i koštanu mineralizaciju (307,308).

1.8.3. Meta-analize polimorfizama ERα i BMD-a

Ioannidis i sur. 2002. god. (309). Ispitali su odnos **XbaI i PvuII** polimorfizama i BMD-a**.** PvuII nije bio povezan s BMD-om bilo kojeg mjesta, a niti s rizikom prijeloma. XbaI je bio povezan s BMD-om i vrata bedrene kosti i slabinske kralježnice. XX je imao veći BMD i manji rizik prijeloma.

U sklopu **GENOMOS** projekta 2004. god. učinjena je velika meta-analiza u kojoj je ispitivana povezanost **ERα** gena i BMD-a, te rizika prijeloma (72). U studiju je bilo uključeno 18.917 ispitanika, od kojih su 14.622 bile žene, a 4.295 muškarci, iz 8 Europskih centara. Nijedan od 3 ispitana polimorfizma (**XbaI, PvuII i promoter TA ponavljajući mikrosatelit**) ili haplotipa nisu pokazali nikakav statitički značajan učinak na BMD. Za PvuII i promoter TA ponavljajući mikrosatelit nije nađena povezanost s rizikom prijeloma. Jedino je XbaI polimorfizam bio povezan s rizikom prijeloma, mehanizmom neovisnim o BMD-u. U studiji nije učinjena podjela na podgrupe pre- i postmenopauzalnih žena, pa nedostaje i analiza podataka u tom smislu.

1.8.4. Spoznaje o odnosu polimorfizama gena za VDR, COL1AI i ERα proistekle iz rezultata pojedinačnih studija i meta-analiza

Na osnovu rezultata dosadašnjih brojnih pojedinačnih studija u kojima je ispitivan odnos polimorfizama gena za VDR, ERα i COL1AI i BMD-a i meta-analiza koje se odnose na postmenopauzalne eutireoidne žene, u koje spadaju i zadnje velike meta-analize učinjene u sklopu GENOMOS projekta, može se zaključiti:

1. Utjecaj VDR gena i njegovih polimorfizama BsmI, **TaqI**, ApaI i FokI na BMD je nesiguran, vjerojatno nije značajan. Do sada nije sa sigurnošću potvrđeno postojanje povezanosti ovih polimorfizama i BMD-a niti u premenopauzalnih, niti u postmenopauzalnih eutireoidnih žena. Nađena je tek slaba statistički značajna povezanost Cdx2 polimorfizma i prijeloma kralježaka u postmenopauzalnih žena.

   Samo u jednoj meta-analizi ispitivan je odnos polimorfizma BsmI VDR gena i BMD-a u ***premenopauzalnih žena*** i nije nađena povezanost**.**
2. Nađena je povezanost **Sp1** polimorfizma COL1AI i BMD-a u području slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti i u žena i u muškaraca. Nije nađena povezanost sa

svim prijelomima. Nađena je samo blaga veza s incidentalnim prijelomima kralježaka u žena i moguće u muškaraca.

I za ovaj gen, podaci o povezanosti s BMD-om u premenopauzalnih žena su vrlo oskudni.

3. Do sada nije dokazana povezanost ERα gena i njegovih polimorfizama, **PvuII** i promoter TA ponavljajućeg mikrosatelita na BMD. Moguća je, ali ne i sigurna, slaba veza PvuII polimorfizma i BMD-a, ali samo u premenopauzalnih eutireoidnih žena. Nađena je jedino slaba veza XbaI polimorfizma i prijeloma, mehanizmom vjerojatno neovisnim o BMD-u. Nađen je zaštitni učinak XX genotipa na rizik prijeloma kralježaka podjednak i u muškaraca i u žena.

   Do sada međutim, nije ispitivan utjecaj polimorfizama XbaI i PvuII na BMD u premenopauzalnih žena.

1.8.5. Genetika osteoporoze u premenopauzalnih žena

Broj studija u kojima je ispitivan odnos genskih polimorfizama i koštane mase u **premenopauzalnih žena** je relativno mali, svega 40-tak, a rezultati su kontradiktorni.

Kammerer i sur. nalaze u „linkage“ studiji razlike između spolova i dobi u povezanosti pojedinih QTL i BMD-a. Tako nisu našli nijednu QTL koja bi bila povezana s BMD-om podlaktice i vrata bedrene kosti u premenopauzalnih žena (30).

Neki autori su ispitivali povezanost SNP-ova i BMD-a u premenopauzalnih žena. Našli su povezanost SNP-ova gena za LRP5, ER, IGF-1, VDR, IL-6 i BMD-a u premenopauzalnih žena (310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320). Tokita i sur. našli su povezanost BsmI polimorfizma gena za VDR i BMD-a, kao i brzine koštane pregradnje u premenopauzalnih žena (321). Keen i sur. su u studiji 1.706 dizigotnih blizanaca ženskog spola, dobi od 18 do 72 godine, našli značajnu povezanost polimorfizma za TGFβ1 i BMD-a vrata bedrene kosti sa značajnim rizikom za osteoporozu u području vrata bedrene kosti u premenopauzalnih žena (322).

Drugi autori nisu našli povezanost SNP-a A986S gena za „kalcij-senzing“ receptor i polimorfizama FokI i BsmI gena za VDR i BMD-a u premenopauzalnih žena (323,324,325,326), dok Garnero i sur. ne nalaze povezanost između intenziteta koštane pregradnje i BMD-a i polimorfizama BsmI, TaqI, i ApaI VDR gena (327).

Yamada i sur. analizirali su povezanost 6 gena kandidata i BMD-a u muškaraca i žena. Našli su da su različiti geni povezani s BMD-om u muškaraca, premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (328,329). Eckstein i sur. nisu našli povezanost polimorfizama BsmI, TaqI i ApaI gena za VDR i polimorfizma A986S gena za kalcij-senzing receptor ni u muškaraca ni u premenopauzalnih žena (330). Long i sur. našli su povezanost APOE haplotipa i BMD-a u muškaraca, ali ne i u žena (331). Yamada nalazi povezanost polimorfizma gena za osteoprotegerin i BMD u žena, ali ne i u muškaraca (332).

U nekim od tih radova nađena je razlika između premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena u postojanju veze gena i BMD-a. Neki su našli povezanost polimorfizama ponavljajućeg dinukleotida citozin-adenin (CA), XbaI i Pvu II ERα gena i AP1 vezujućeg mjesta TCIRG1 gena i BMD-a samo u premenopauzalnih žena, ali ne i u postmenopauzalnih (333,334,335,336). Drugi autori nalaze povezanost SNP-a i BMD-a samo u postmenopauzalnih žena, ali ne i u premenopauzalnih (gen za kalcitonin) (337). Zhang i sur. našli su povezanost polimorfizmama XbaI i PvuII ERα gena i ApaI VDR gena s BMD-om u premenopauzalnih žena i utjecaj interakcije gena za ERα i VDR na BMD u postmenopauzalnih žena (338). Ho i sur. nalaze povezanost PvuII polimorfizma gena za ERα i BMD-a, ali s utjecajem SNP-a na BMD na različitim mjestima skeleta u žena u premenopauzi i postmenopauzi (339).

Neki autori nalaze povezanost genskih polimorfizama (AC haplotip (A2014 i C3768) gena za ERα, BsmI gena za VDR, AluI gena receptora za kalcitonin - CTR, Sp1 COL1A1, IL-6) i BMD-a neovisno o menopauzi (340,341,342,343). Drugi autori ne nalaze značajnu povezanost BMD-a i SNP-ova ispitivanih gena (BsmI, TaqI, ApaI i FokI gena za VDR, HindIII gena za osteokalcin, T950C polimorfizam u promoter regiji gena za osteoprotegerin, Sp1 COL1A1) neovisno o menopauzi (6,344,345,346,347).

1.8.6. Genetika osteoporoze u muškaraca

Rjeđe su rađena ispitivanja odnosa genskih polimorfizama i rizika osteoporoze i prijeloma u **muškaraca** (29,328,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358, 359,360,361,362,363, 364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377) s također kontradiktornim rezultatima. Učinjeno je nekoliko manjih meta-analiza, a unatrag 3 godine u okviru GENOMOS projekta učinjene su 3 velike meta-analize s oko 20.000 ispitanika. Do

sada je u okviru GENOMOS projekta, ispitana povezanost polimorfizama gena za ER, COL1A1 i VDR i BMD-a i osteoporotičnih prijeloma (34,71,72). Iako je broj ispitanika u tim velikim meta-analizama izosio oko 20.000, broj muškaraca u njima još uvijek je bio relativno nizak, manji od preporučljivih 10.000 (4.295-7.837). Za najčešće ispitivani gen VDR nije nađena povezanost ispitivanih polimorfizama (FokI, BsmI, ApaI, TaqI i Cdx2) s BMD-om ni u muškaraca ni u žena. U muškaraca nije nađena povezanost ni s prijelomima, dok je u žena nađena moguća povezanost Cdx2 alela VDR gena i prijeloma kralježaka, neovisna o BMD-u (71). Nađena je slaba povezanost polimorfizama gena za COL1A1 Sp1 i BMD-a u području slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti u muškaraca podjednako kao i u žena, koja objašnjava svega oko 2% ukupne varijabilnosti BMD-a. Nije nađena povezanost polimorfizma gena za COL1A1 Sp1 i svih prijeloma. Nađena je moguća slaba povezanost u muškaraca (34). Nije nađena povezanost polimorfizama gena za ER i BMD-a ni u muškaraca ni i u žena. Nađena je povezanost polimorfizama gena za ERα i rizika prijeloma mehanizmom neovisnim o BMD-u, posebno prijeloma trupa kralježaka u muškaraca. Nije nađena značajna razlika između muškaraca i žena (72).

1.8.7. Polimorfizmi TaqI VDR, PluII ERα i Sp1 COL1AI i BMD u eutireoidnih žena

Do sada je najčešće ispitivan odnos polimorfizama gena za VDR, ER i COL1AI i BMD-a, jer su to geni za koje se pretpostavljalo da igraju značajnu uklogu u koštanoj pregradnji i da bi mogli determinirati koštanu masu.

Gen za vitamin D receptor (VDR) nalazi se na kromosomu 12, lokusu 12q12-q14 i sadrži 11 eksona (378). Zajedno s promoter regijom premošćuje preko 100 kB, dok sam VDR gen obuhvaća približno 75 kb. Intronski fragment na 3-početnom kraju eksona 1C objašnjava molekularni mehanizam poticanja ekspresije VDR putem retinoične kiseline.

Gen za ER alfa (ER1) dug je preko 140 kB i sadrži 8 eksona, a lokus se nalazi na 6q25.1. ER1 je prisutan u oba spola u: jetri, frontalnom korteksu, nucleus caudatusu, locus coeruleusu, cerebellumu, Moebiusovim glandulama na gornjim očnim kapcima (kojima nedostaju androgeni receptori). ER1 se nalazi na osteoblastima i hondrocitima, a utječe i na procese diferencijacije osteoblasta iz fibroblasta u koštanom tkivu (379, 380, 381).

Lokus za alfa 1 lanac kolagena tipa I nalazi se na 17q21.31-q22.05, a za alfa 2 lanac kolagena tipa I na 7q22.1 (382). Oko 80-95% ukupnih proteina koštanog matriksa čini kolagen tipa I. Molekula kolagena tipa 1 je heterotrimer sačinjen od spiralno povezana tri vlakna (2 α1 i 1 α2 lanac koji su strukturno slični, ali genetski različiti). Osim u kostima, tip 1 kolagena nalazi se još u koži i tetivama.

1.8.7.1. Polimorfizmi TaqI VDR, PvuII ERα i Sp1 COL1AI i BMD u premenopauzalnih eutireoidnih žena

Do sada je objavljeno 18 studija učinjenih u premenopauzalnih eutireoidnih žena u kojima je ispitivan odnos ovih polimorfizama i BMD-a.

U 4 studije ispitivan je odnos **TaqI** polimorfizma gena za VDR i BMD-a u premenopauzalnih žena koje nisu bolovale od hipertireoze i nije nađena povezanost između njih (6,344,345,383).

U 11 studija ispitivan je odnos **PvuII** polimorfizma ERα gena i BMD-a u premenopauzalnih žena koje nisu bolovale od hipertireoze. U 6 studija nađena je povezanost PvuII i BMD-a (317,335,338,339,343,384). Pri tome izgleda da je značajan utjecaj menopauze na ispoljavanje utjecaja ovog polimorfizma na BMD. U 2 studije nađena je povezanost PvuII polimorfizma i BMD-a u premenopauzalnih žena, ali ne i u postmenopauzalnih (335,384). U jednoj studiji nađena je povezanost PvuII polimorfizma i BMD-a u premenopauzalnih, ali ne i u postmenopauzalnih žena, ali se radilo o ERβ genu (333). U jednoj studiji je nađena interakcija PvuII polimorfizma i "mršave" tjelesne mase s utjecajem na BMD vrata bedrene kosti, ali samo u postmenopauzalnih, a ne i u premenopauzalnih žena i muškaraca (235). U jednoj studiji nađen je utjecaj PvuII polimorfizma na BMD, ali se on ispoljava na drugim mjestima skeleta u žena u premenopauzi nego u žena u postmenopauzi (339**).** U 3 studije nije nađena veza BMD-a s PvuII polimorfizmom (314,336,385).

Što se tiče Fok1 polimorfizma VDR gena kojeg su ispitivali Obermayer-Pietsch i Ban u svojim studijama, do sada je objavljeno samo 5 radova. U 3 rada nije nađena povezanost Fok1 polimorfizma i BMD-a u premenopauzalnih žena (324,326,388). U 2 rada nađena je povezanost (314,386). U jednom radu nije nađena povezanost Fok1 polimorfizma i BMD-a u premenopauzalnih žena, ali je nađena povezanost s BMD-om u prepubertetskih djevojčica i to u sklopu haplotipa zajedno s BsmI i ApaI polimorfizmima (387).

U 4 studije ispitivan je odnos **Sp1** polimorfizma gena za COL1AI i BMD-a u premenopauzalnih žena koje nisu bolovale od hipertireoze. Hustmyer i sur. u studiji s mono- i dizigotnim premenopauzalnim ženama blizancima nisu našli povezanost Sp1 polimorfizma COL1AI gena niti s BMD-om niti s prijelomima kosti (388). Wynne i sur. nisu našli povezanost polimorfizma COL1AI gena i BMD-a u premenopauzalnih žena, a isto tako ni Lau i sur. (384,389). Učinjena je još jedna studija u kojoj nije nađena povezanost 1997G-->T genotipa COL1AI gena s BMD-om u premenopauzalnih žena, ali je nađena povezanost u postmenopauzalnih žena (390).

1.8.7.2. Polimorfizmi TaqI VDR, PluII ERα i Sp1 COL1AI i BMD u postmenopauzalnih eutireoidnih žena

Radi se o velikom broju studija učinjenih prvenstveno u postmenopauzalnih žena ili studija u kojima ispitanice nisu bile razdijeljene u postmenopauzalne i premenopauzalne, a koje su do sada dale kontradiktorne rezultate, zbog čega su kasnije rađene i meta-analize. Rezultati su kontradiktorni, pa se pokušalo meta-analizama doći do objektivnije procjene postojanja ove povezanosti.

Do sada je učinjeno više meta-analiza u kojima je analizirana moguća veza ovih polimorfizama i BMD-a u postmenopauzalnih eutireoidnih žena.

U 3 meta-analize ispitivan je odnos **Taq I polimorfizma VDR gena** i BMD-a i nije nađena povezanost ovog polimorfizma s BMD-om, a u jednoj meta-analizi ispitivana je povezanost s prijelomima i nije nađena povezanost (71,302,303). Samo u jednoj meta-analizi nađena je povezanost s BMD-om ali u sklopu haplotipa, ali ne i pojedinačno (301).

U dvije meta-analize u kojima je u postmenopauzalnih eutireoidnih žena ispitivan odnos **PvuII** polimorfizma **ER** gena i BMD-a nije nađena povezanost ni s BMD-om ni s prijelomima (72,305).

U tri meta-analize ispitivan odnos polimorfizama Sp1 **COLIA1** gena i BMD-a u postmenopauzalnih eutireoidnih žena i nađena je povezanost s BMD-om i slaba povezanost s prijelomima(34,306,307).

1.8.8. Genetika sekundarne osteoporoze

Uzimajući u obzir ukupan broj genetskih studija u bolesnika s osteoporozom, te veliki broj uzroka sekundarne osteoporoze, mali je broj studija u kojima je ispitivana genetska osnova **sekundarne osteoporoze.** Do sada je ispitivan odnos genskih polimorfizama i BMD-a u bolesnika s: talasemijom (391), terminalnom bubrežnom insuficijencijom (392), bolesnika na hemodijalizi (393), nakon transplantacije bubrega (394), inzulin ovisnim diabetes mellitusom (395,396), steroidnom osteoporozom (397,398), idiopatskim hipogonadotropnim hipogonadizmom (399), reumatoidnim artritisom (400,401,402), juvenilnim idiopatskim artritisom (403), ankilozantnim spondilitisom (404), primarnom bilijarnom cirozom (405,406,407,408,409,410), nakon transplantacije jetre (411), Crohnovom bolešću (412,413,414), celijakijom (415,416,417), malapsorpcijom laktoze (418,419,420) i hipertireozom (421,422). U nekim ispitivanjima je nađena povezanost genskih polimorfizama i BMD-a, dok u drugim nije. Međutim, obzirom da se uglavnom radi o samo 1-3 (najviše 6) ispitivanja za jednu bolesti i da su ispitivanja učinjena na manjem broju bolesnika, ne može se sa sigurnošću zaključivati o značaju tih rezultata. Rezultate ovih studija bi tek trebalo provjeriti u budućim studijama na znatno većem broju ispitanika i testirati veći broj gena i njihovih polimorfizama s BMD-om i prijelomima.

1.8.9. Genetika sekundarne osteoporoze uzrokovane hipetireozom

Samo u dvije studije ispitivana je genetska osnova sekundarne osteoporoze uzrokovane hipertireozom. Ispitivan je utjecaj polimorfizama Bsm I i Fok I gena za VDR na BMD u bolesnica s hipertireozom, a rezultati nisu jednoznačni. Dok je u jednom radu nađena povezanost Bsm I polimorfizma i BMD-a, rezultati koji se odnose na vezu Fok I polimorfizma i BMD-a nisu potpuno podudarni.

Obermayer-Pietsch i sur. ispitali su odnos **Bsm I i Fok I polimorfizama VDR** gena i BMD-a u 76 postmenopauzalnih žena s hipertireozom i 62 zdrave postmenopauzalne žene u kontrolnoj skupini (421). BMD je mjeren DXA metodom u slabinskoj kralježnici i PQCT metodom u distalnom radiusu (engl. peripheral quantitative computed tomography = periferna kvantitativna kompjuterizirana tomografija). Na ovaj način mjeren je BMD u području kortikalne i trabekularne kosti. Nađena je statistički značajna povezanost BB polimorfizma s BMD-om, dok nije nađena povezanost Fok I polimorfizma s BMD-om. U grupi hipertireoidnih bolesnica s niskim BMD-om BB genotip je nađen u 39%, što je znatno češće nego u kontrolnoj skupini (13%, p= 0,003) i u bolesnica s hipertireozom i normalnim

BMD-om (6%, p=0,013). Kumulativni rizik za niski BMD u postmenopauzalnih bolesnica s hipertirozom i BB genotipom bio je 31.4 (95% CI, 3,9-256; p=0,0003).

Drugo ispitivanje učinili su **Ban i sur.** 2000. god. (422). Oni su ispitali odnos između polimorfizma **FokI gena za VDR** i BMD-a distalne trećine palčane kosti, te biljega koštane pregradnje u 131 bolesnice s Gravesovom bolešću**,** dobi od 25 do 78 godina i 150 zdravih žena u kontrolnoj skupini. Od 131 ispitanice 22 su bile neliječene, 18 je liječeno medikamenozno, a 91 je bila u remisiji dužoj od 6 mjeseci. Bolesnice koje su bile u remisiji dužoj od 6 mjeseci (91) bile su dobi 47-78 godina, a remisija je trajala od 0.5 do 22 godine. Nije navedeno jesu li ispitanice koje su bile neliječene i (22) i liječene medikamentozno (18) bile u remisiji, te kakva je bila njihova dobna struktura, ali se indirektno naslućuje da nisu bile u remisiji. Obzirom da je remisija bila definirana s 2 kriterija (negativna protutijela i eutireoidno stanje u trajanju od najmanje pola godine) bolesnice koje nisu u remisiji ne moraju nužno biti i hipertireoidne, a taj podatak nedostaje. BMD je mjeren aparatom marke DTX-200, Osteometer, Copenhagen, a rezultati su izražavani u apsolutnim vrijednostima i kao z-score. Od biljega koštane pregradnje određivani su osteokalcin, koštani izoenzim alkalne fosfataze, hidroksiprolin i deoksipiridinolin u urinu. Autori nisu našli povezanost Fok1 polimorfizma i BMD-a u distalnoj trećini palčane kosti u grupi ispitnica u remisiji (91). Međutim, našli su povezanost FokI genotipa i BMD-a u podgrupi ispitanica koje su bile do 5 godina u remisiji. Ispitanice koje su bile Ff heterozigoti, a bile su u remisiji kraćoj od 5 godina, imale su značajno niži z-score od homozigota ff ($p<0.05$) i FF ($p<0.05$). Našli su i višu razinu koštane alkalne fosfataze u krvi u Ff heterozigota nego u FF homozigota ($p<0.05$) u svih bolesnica u remisiji kao i u podgrupi bolesnica koje su bile do 5 godina u remisiji. Nije nađena nikakva povezanost FokI polimorfizma i osteokalcina, hidroksiprolina i deoksipiridinolina u urinu u bolesnica koije su bile u remisiji. Nalazi impliciraju da je Ff genotip čimbenik rizika za pojačan gubitak koštane mase u Basedovljevoj bolesti, a u remisiji dolazi do pojačane aktivnosti osteoblasta izražene pojačanim lučenjem alkalne fosfateze i povišenom razinom koštane alkalne fosfataze u krvi i ubrzanog rasta koštane mase, pa se nakon 5 godina remisije koštana masa u ovih bolesnica više ne razlikuje od koštane mase bolesnica sa FF i ff genotipom, iako i dalje ostaje blago pojačana aktivnost osteoblasta karakterizirana povišenom razinom koštanog izoenzima alkalne fosfataze u krvi u bolesnica s Ff genotipom. Iz članka međutim, nije vidljivo jesu li postojale razlike u odnosu polimorfizma FokI i z-scora između premenopauzalnih i postmenopauzalnih bolesnica u remisiji.

Obermayer-Pietsch i sur. su kao i Ban i sur. ispitali odnos FokI polimorfizma i BMD-a. Međutim, prisutne su značajne razlike u njihovim radovima, zbog čega je otežano poređenja ova dva ispitivanja. Obermayer-Pietsch i sur. su ispitivanje proveli u postmenopauzalnih bolesnica s hipertireozom (pri tome nisu sve bolesnice bolovale od Basedovljeve bolesti), 5 mjeseci nakon postavljanja dijagnoze i započinjanja liječenja, dok su Ban i sur. ispitivanje proveli u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena, ali bez razdvajanja bolesnica u dvije skupine. Osim toga, Ban je ispitivanje proveo u bolesnica koje su bile u remisiji najmanje pola godine (0,5-22 godine), što je značajna razlika u studiji, jer jedna studija govori o riziku gubitka koštane mase u hipertireozi, a druga o brzini oporavka koštane mase u remisiji Basedovljeve bolesti. Ni mjesta mjerenja BMD-a na skeletu, kao ni metode mjerenja BMD-a, a niti aparati, nisu bili jednaki. Ipak, uz sav oprez zbog navedenih razlika, možemo zaključiti da studija Obermayer-Pietsch i sur. nije pokazala nikakav utjecaj polimorfizma FokI na BMD u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom, dok studija Bana i sur. implicira mogući utjecaj polimorfizma FokI na BMD u bolesnica s Basedovljevom bolešću za vrijeme aktivnosti, bez određenja prema menopauzi.

U dva ispitivanja nađen je i utjecaj TR na funkciju ER koji je također uključen u proces pregradnje kosti (423,424). Nađena je interakcija response elemenata tiroksina i estrogena (425). TR utječu na funkciju proteina koaktivatora (SRC1, SRC2, TRAP220, TRBP, p300 i ARA70), a također i korepresora (RIP140 i DAX-1) (426). Hormoni štitnjače vežu se za TRE (engl. tiroxine response element = element koji reagira na tiroksin) koji djeluje na ERE (engl. estrogen response element = element koji reagira na estrogen) uzrokujući porast broja estrogenih receptora i pojačan odgovor stanice na estrogene ili se TR veže za ERE i na taj način modificira aktivnost gena (427,428).

1.9. Polimorfizmi gena za VDR i ER i Basedowljeva bolest i Hashimotov tireoiditis

Od 1979. godine provedeno je niz ispitivanja povezanosti genskih polimorfizama i autoimunih bolesti štitnjače u kojima su ispitivani geni za: C2, C3, C4 komponente komplementa, properdin faktor Bf, Ig, T limfocitni receptor beta lanac, CTL-4, TPO, receptor za tireoidni hormon, tireoglobulin, SEL1L, VDR, ER, kao i kromosomske regije povezane s većim rizikom bolesti (429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444, 445,446, 447,448,449,450) s kontradiktornim rezultatima.

U pet studija ispitivan je odnos polimorfizma VDR gena i autoimunih bolesti štitnjače (422,451,452,453,454), a u 3 studije odnos ER i autoimunih bolesti štitnjače (455,456,457), također s kontradiktornim rezultatima.

2. CILJ ISPITIVANJA

Osteoporoza je bolest s poligenskom osnovom. Do sada je učinjen veliki broj studija u kojima je ispitivana genetska osnova BMD-a i primarne osteoporoze s često kontradiktornim rezultatima. Mali je broj studija u kojima je ispitivana genetska osnova sekundarne osteoporoze. U samo dvije studije ispitivana je veza genskih polimorfizama i BMD-a u bolesnika s hipertireozom.

Hipoteza: osteoporoza u premenopauzalnih žena s hipertireozom ima poligensku osnovu, a polimorfizmi gena za receptor vitamina D (VDR), alfa 1 lanac kolagena I (COL1AI) i estrogeni receptor alfa (ERα) utječu na gubitak koštane mase i nastanak osteoporoze.

Cilj ovog ispitivanja je ispitati postoji li povezanost polimorfizama TaqI gena za vitamin D receptor (TT, Tt i tt genotip), BalI Sp1 regije gena za COLIA1 (SS, Ss i ss) i PvuII gena za estrogeni receptor (PP, Pp i pp genotip) i BMD-a slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom.

3. ISPITANICE

Ispitivanje je provedeno u 45 premenopauzalnih bolesnica s ustanovljenom dijagnozom hipertireoze u kojih je prošlo najmanje godinu dana od postavljanja dijagnoze. Odabrane su ispitanice u premenopauzalnom periodu i bez drugih poznatih čimbenika rizika, u kojih hipertiroza predstavlja jedini poznati čimbenik rizika na gubitak kosti. Postavljen je kriterij odabira da je prošlo najmanje godinu dana od postavljanja dijagnoze hipertireoze, jer se za to vrijeme očekuje gubitak denzitometrijski mjerljive količine koštane mase (denzitometar ima grešku mjerenja od oko 1%, a tijekom godinu dana u bolesnica s hipertireozom izgubi se preko 1% koštane mase). U ispitivanje su uključene ambulantne bolesnice koji se liječe u Zavodu za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb i Klinike za nuklearnu medicinu KBC Zagreb.

Kriteriji za dijagnozu hipertireozu bili su: suprimiran TSH (TSH<0,01 mIU/l), povišena koncentracija T3 (>2,5 nmol/l) i/ili T4 (>165,0 nmol/l) u trenutku postavljanja dijagnoze. TSH je određivan visoko-senzitivnom IRMA metodom (engl. immunoradiometric assay), dok su T3 i T4 određivani RIA metodom (engl. radioimmunoassay).

Kriteriji za odabir ispitanica bili su:

1. da je liječenje hipertireoze započelo prije godinu dana
2. dob ispitanica: 25 - 50. godine života (uvjet je da još nije nastupila menopauza)
3. uredni menstrualni ciklusi prije postavljanja dijagnoze hipertireoze
4. da ne boluju od druge kronične bolesti i ne uzimaju lijekove koji mogu utjecati na metabolizam kosti
5. suglasnost bolesnica

Prosječna dob ispitanica iznosila je 40,4±7,7 godina, a prosječan indeks tjelesne mase (ITM) 23,5±3,9 kg/m^2.

Sve ispitanice su bile upoznate s istraživanjem (prilog 1.) i potpisale su pristanak za ispitivanje (obrazac u prilogu 2.).

U prilogu 3. je odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Zagreb.

4. METODE

U bolesnica je učinjeno denzitometrijsko mjerenje BMD-a DXA metodom u području slabinske kralježnice (L1-L4) i vrata bedrene kosti. Rezultati su komparirani s rezultatima genetskih pretraga. Korišteni su kriteriji SZO za: osteopeniju T score između -1,0 i -2,49, a za osteoporozu T score < -2,5 na jednom ili oba mjerena mjesta.

Analiza polimorfizma gena učinjena je metodom "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) lokusa: TaqI gena za vitamin D receptor (TT, Tt i tt genotip), lokusa PvuII gena za estrogeni receptor (PP, Pp i pp genotip) i lokusa BalI gena za COLIA1 (SS, Ss i ss).

4.1. Denzitometrija

Mineralna gustoća kosti mjerena je denzitometrijski, DXA metodom. DXA je metoda koja koristi x-zrake dvije jačine u vrlo maloj dozi, koje se propuštaju kroz kost, a iza kosti senzori registriraju x-zrake koje su prošle kroz kost i šalju informaciju u računalo koje iz razlike energije propuštenih i apsorbiranih x-zraka izračunava mineralnu gustoću kosti. BMD je mjeren u području slabinske kralježnice (Ll-L4) i vrata bedrene kosti. Korišten je denzitometar QDR 4500-W firme «Hologic», Hologic Waltham, MA, USA, proizveden 1997. god., koji se nalazi u Klinici za nuklearnu medicinu KBC Zagreb (Slika 5.). Greška mjerenja je <1%. Doza zračenja po jednoj denzitometriji je vrlo niska, 3-5 mRema. Rezultati mjerenja izraženi su u apsolutnim vrijednostima g/cm^2 i kao T score, koji predstavlja odstupanje izmjerenih rezultata od referentnih vrijednosti (a to je prosječan vršni BMD koji se dostiže u mladih djevojaka) izraženo u standardnim devijacijama.

BMD je mjeren u području slabinske kralježnice od L1 do L4 kralješka i vrata bedrene kosti. Kralješci i vrat bedrene kosti predstavljaju dva različita tipa koštanog tkva, pa mjerenje u ovim regijama ne daje samo informacije o BMD-u u mjerenim područjima, nego i o BMD-u u ostalim kostima u kojima se nalazi određeni tip koštanog tkiva. U području

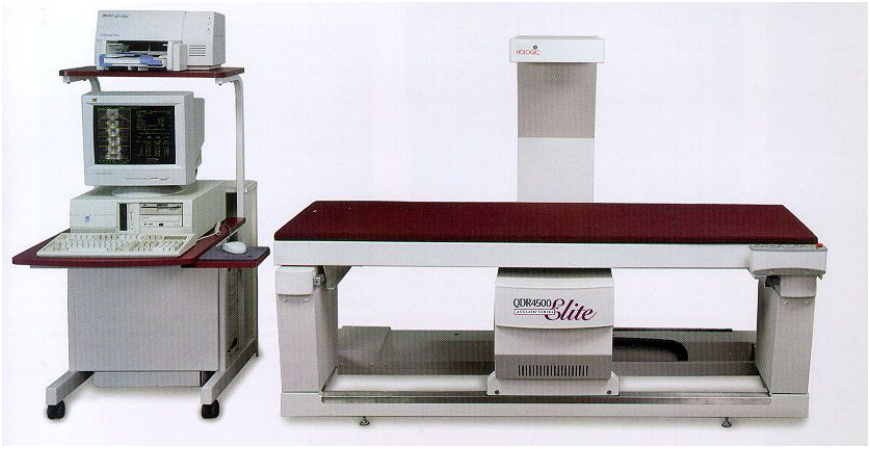
slabinske kralježnice dominira trabekularna kost, dok je vrat bedrene kosti sačinjen uglavnom od kortikalne kosti.

Svjetska zdravstvena organizacija je 1994. god. usvojila kvantitativnu definiciju osteoporoze zasnovanu na denzitometrijskom mjerenju mineralne gustoće kosti i procjeni T vrijednosti. Ovisno o T score-u rezultati označavaju različitu koštanu masu:

- povećana koštana masa:……T > +1
- normalna koštana masa:……T između: -0,99 i +0,99
- osteopenija:…….....T između: -1,0 i -2,49
- osteoporoza:……...T < - 2,5
- teška osteoporoza:.....T < - 2,5 i prijelomi kosti

Smanjen BMD povezan je s povećanim rizikom prijeloma kosti. Svako smanjenje BMD-a za 1 s.d. povezano je s porastom rizika novog prijeloma kralješka 1,4-1,6 puta.

Slika 5. Denzitometar QDR 4500-W firme «Hologic»



4.2. Genetske analize

Genetske analize učinjene su u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava

Analiza polimorfizma gena učinjena je RFLP metodom (engl. restriction fragment length polymorphism = polimorfizam duljine fragmenata DNA nastalih rezanjem restrikcijskim enzimima) lokusa TaqI gena za vitamin D receptor (TT, Tt i tt genotip), lokusa BalI gena za COLIA1 (SS, Ss i ss) i lokusa PvuII gena za estrogeni receptor (PP, Pp i pp genotip).

Za genetske analize korištena je DNA izdvojena iz leukocita. Leukociti su izdvojeni iz periferne venske krvi kojoj je nakon vađenja dodan antikoagulans (EDTA).

Za izolaciju DNA korištena je periferna venska krv, a postupak je izvršen standardnom metodom ekstrakcije s fenolom i kloroformom. Koncentracija i čistoća DNA izmjerene su spektrofotometrijski, a elektroforezom u gelu agaroze procijenjena je kvaliteta (sačuvanost velikih molekula) DNA.

RFLP metoda prikazuje varijacije među osobama u duljini DNA fragmenata nakon rezanja specifičnim restrikcijskim enzimima. Restrikcijski enzimi su proteini koji prepoznaju specifične kratke nukleotidne sekvence te režu DNA na tim mjestima. Polimorfizmi su obično uzrokovani mutacijama na mjestu rezanja enzima. Dio odsječka gena koje nosi i potencijalno restrikcijsko mjesto najprije je umožen tehnikom lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction = PCR). Dio umnoženih molekula (obično 1/5 umnoška PCR-a) izložen je odgovarajućoj restrikcijskoj endonukleazi te su rezultati ovog pokusa ponovno analizirani elektroforezom u gelu agaroze. Ako je postojalo mjesto rezanja enzima tada se kao rezultat moglo uočiti dva kraća fragmenta čija duljina zbrojem odgovora originalnom PCR umnošku.

a) Materijali

KEMIKALIJE

U eksperimentalnom radu korištene su slijedeće kemikalije :

- NaK – EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina
- Lymphoprep, Ficoll
- Etidijev bromid

- Magnezijev klorid
- dNTP
- Taq DNA polimeraza
- Agaroza
- Borna kiselina
- Bromfenol plava
- 70 % etanol
- apsolutni etanol
- kloroform
- ledeni izopropanol
- NaOH
- DNA – PCR Core reagencijski set (Applied Biosystems)
- QIAamp® DNA Blood Mini Kit (reagencijski set za izolaciju DNA iz stanica pune krvi) Cat No 51104

OTOPINE I PUFERI

Fiziološka otopina (0,9% NaCl)

TBE pufer (5 X):

Tris		27	g
Borna kiselina		13,75	g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	do	500	ml vode

TBE pufer (1X) radni za elektroforezu

TBE (5)	50 ml
Redestilirana voda	450 ml

LOADING pufer (pufer za nanašanje na gel)

50 % glicerol		25,0	g
1 mM EDTA pH 8,0		0,1	ml
0,25 % bromfenol plava		0,125	g
H_2O (autoklavirana na 121 ^oC)	do	50,0	ml

TAE pufer

0,4 M TRIS	24,22	g

10 mM EDTA	1,861	g
octena kiselina	5,72	ml

UREĐAJI

- centrifuge: Hettich Rotanta 460R, sa hladjenjem
- Hettich mikrocentrifuga Mikro200R, sa hadjenjem
- vortex
- vodena kupelj
- spektrofotometar (Bio Spec – 1601 E, Shimadzu)
- aparatura za autoklaviranje
- aparatura za elektroforezu u agaroznom gelu
- termomješalica Eppendorf Comfort
- sustav za fotografiranje u UV svjetlu sa digitalnom kamerom Q-EL 330 Elchrom Scientific
- aparati za provođenje lančane reakcije polimerazom- termoblokovi (AB Gene Amp PCR System 2400 i 2700)

b) Metode

IZOLACIJA DNA

Mjerna metoda je kemijska izolacija iz venske krvi. To je tehnika kojom se liziraju stanice, a zatim enzimski ili kemijski ekstrakcijama uklanjaju stanični protein, RNA i druge makromolekule nakon čega slijedi precipitacija DNA alkoholom te otapanje u puferu. Izvodi se u sterilnom kabinetu.

REAGENSI I POSTUPAK S REAGENSIMA ZA IZOLACIJU DNA

1. RETIC 5 X

NaCl	40,9 g	20,45 g
KCl	1,95 g	0,975 g

$MgCl_2X6H_2O$	7,1 g	3,55 g
De-voda	do 1000 ml	do 500 ml

Autoklavirati, rastočiti po 100 ml i zamrznuti

2. RETIC 1X

RETIC 5 X	100 ml
Sterilna voda	400 ml

3. LYSING pufer

NH_4Cl	7,14 g	3,570 g	1,428 g
NH_4HCO_3	0,07 g	0,035 g	0,014 g
De-voda	do 1000 ml	do 500 ml	do 200 ml

4. STE pufer pH 7,4

0,1 m NaCl	5,85 g	2,925 g
0,05 M TRIS	6,06 g	3,03 g
1mM EDTA	0,37 g	0,185 g
De-voda	do 1000 ml	do 500 ml

5. PROTEINAZA K

10 mg / ml

25 mg proteinaze K otopiti u 2,5 ml 10 mM Trisa pH 7,4

6. FENOL – gotovi reagens < Sigma >

7. KLOROFORM – gotovi reagens < Kemika >

8. 96 %-tni ETANOL gotovi reagens < Kemika >

9. TE pufer pH 7,5

10 mM Tris	1,21 g
1 mM EDTA	0,37 g
De-voda	do 1000 ml

Autoklavirati

OPIS POSTUPKA IZOLACIJE DNA

Venepunkcijom se krv oduzme u epruvetu sa 5,7 %-tnim EDTA-Na, 10 ml, standardno Vacutainer®, iz koje se prebaci u Falcon plastičnu epruvetu od 50 ml. Retic otopinom se dopuni volumen do punih 50 ml. Promiješa se nekoliko puta i centrifugira 10 minuta na 2500 okretaja na 4ºC. Supernatant se aspirira Pasteurovom pipetom tako da se čuva sloj leukocita na dnu. Postupak ispiranja se ponovi dva puta. Zatim se stanice razore (liziraju) s 30 ml svježe pripremljene otopine NH_4HCO_3 (tzv. lizing otopina) laganim miješanjem na sobnoj temperaturi 10 minuta. Slijedi centrifugiranje 10 minuta na 2500 okretaja na 4ºC. Supernatant (hemolizat) se aspirira i postupak ponovi dva puta. Talog stanica koji se dobije resuspendira se u 500µL STE otopine i sve prebaci u tube od 2 ml. U svaki uzorak doda se 13,33µL Proteinaze K (15,1 mg / ml). Mješavina se inkubira preko noći na 37ºC uz miješanje, otopina mora biti viskozna. Ako lekociti nisu potpuno digestirani, otopina se promiješa te inkubacija prolongira. Tako dobivena otopina se podijeli na dvije tube od 2 ml i u svaku doda jednak volumen redesteliranog fenola i vorteksira. Promiješa se na roleru 10 minuta i ostavi na ledu 10 minuta. Ponovo slijedi centrifugiranje, na 13 000 okretaja 10 minuta na +4ºC. Iz uzorka se prenese vodeni viskozni sloj u čistu 2 ml tubicu a ako nije bistro ponovi se postupak sa fenolom. Zatim se u uzorak dodaje 1,5 volumena kloroforma, promiješa na roleru 10 minuta, ostavi na ledu 10 minuta i ponovo centrifugira na 13 000 okretaja na +4ºC kroz 10 minuta. Gornji vodeni sloj, ako je bistar, se prebaci u tubice 2 ml te doda 1,5 volumena ledenog 96%-tnog etanola. U slučaju da vodeni sloj nije bistar ponovi se postupak sa kloroformom. DNA se odmah precipitira, a ako je prinos slabiji ostavi se još neko vrijeme na -20ºC.

Uzorak se centrifugira na 13 000 (+4ºC) 10 minuta, odlije etanol, talog DNA se posuši i otopi u odgovarajućoj količini TE pufera, i to ovisno o procjeni količine DNA, u 100 - 500µL. Na kraju slijedi inkubacija preko noći na 37ºC da bi se potpuno otopio talog DNA. Postupak izolacije DNA iz uzorka pune krvi putem komercijalnog seta za izolaciju opisan je u materijalu proizvođača Qiagen.

KONTROLA DNA

Mjerna metoda je određivanje integriteta, čistoće i koncentracije DNA, provodi se u analitičke svrhe. Kvaliteta DNA je nužna za daljnje PCR amplifikacije. Postupak se izvodi na uređaju BioSpec-1601 E, DNA / PROTEIN / ENZYME ANALYZER; SHIMADZU. Potvrda čistoće i koncentracije DNA je nalaz vrpce visokomolekularne DNA na agaroznom gelu.

NAČELO MJERENJA :

1. PROVJERA ČISTOĆE

Mjeri se apsorpcija vodene otopine DNA na dvije valne duljine 260/280 nm. Izolat DNA zadovoljavajuće čistoće ima A 260 / 280 od 1,8 – 2,0.
Ukoliko je A 260 / 280 < 1,8 prisutno je zagađenje s proteinima ili aromatskim supstancama (fenol).
Ukoliko je A 260 / 280 > 2,0 uzorak je vjerojatno zagađen sa RNA.

2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA

Otopina DNA koja pri valnoj duljini od 260 nm ima apsorpciju 1, sadrži 50μg / ml DNA. Uzorak DNA razrijedi se s TE puferom u omjeru 1:10 ili 1: 100.
Apsorpcija uzoraka DNA izmjeri se na spektrofotometru (Shimadzu) na valnoj duljini 260/280 nm, u kvarcnoj kiveti koja ima dužinu puta zrake 1 cm. Ukupni volumen uzorka za mjerenje je 500 μL.
Koncentracija DNA može se izračunati prema formuli :

Konc. DNA = A_{260} X razrjeđenje X 50 (μg/ml).

3. INTEGRITET DNA

Provjera se provodi elektroforezom na 1 % -tnom agaroznom gelu. Elektroforetskim razdvajanjem jasno se prikaže je li izolirana DNA intaktna, odnosno je li došlo do cijepanja DNA molekule i degradacije.
Gel se fotografira i slika pohrani kao dokument.

UVIJETI MJERENJA:

- ovisno o koncentraciji DNA uzeti 1 – 5 μl izolata DNA i do 5μl TBE pufera
- čitavu količinu DNA + TBE staviti u 2μl loading pufera

- sve to staviti u jažicu na 1 %- tni agarozni gel
- elektroforeza teče 30 minuta (120 V / 50 mA)

REAGENSI I POSTUPAK S REAGENSIMA ZA ELEKTROFOREZU:

0,5 M EDTA pH 0,8: 93,05 g

500 ml vode

pH podesiti sa granulama NaOH (tek onda dolazi do otapanja)

TBE pufer (5X):

Tris	27 g
Borna kiselina	13,75 g
0,5 EDTA (pH 8,0)	do 500 ml vode

Autoklavirati i pohraniti

TBE pufer (1X) radni za elrktroforezu :

TBE 5X	50 ml
DE- voda	450 ml

SASTAV PUFERA ZA NANOŠENJE (loading buffer):

50 % glicerol

1 mM EDTA pH 8,0

0,25 % bromfenol blue

IZRADA GELOVA AGAROZE

Na nosač za gel nalijepi se ljepljiva traka s gornje i donje strane. Zatim se postavi češalj / češljevi ovisno o broju uzoraka. U Erlenmayer tikvicu usipa se odvagana agaroza (%- tak ovisi o tome kakav gel želimo). Obično se radi 1 %- tna agaroza (0,5 g na 50 ml TBE pufera). Agaroza se zagrije i ako je potrebno ohladi pod mlazom vode dok se ne postigne temperatura od 50 – 60 ^{o}C, dodaje Etidijbromid (3 µl), dobro promiješa i izlije na nosač za gel. Pusti da se ohladi i stvrdne (oko 30 minuta), te se zatim pažljivo izvade češljevi, odlijepi traka i nosač prenese u kadu za elektroforezu. Treba paziti da ima dovoljno pufera (gel ispod površine).

IZVOĐENJE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM (PCR)

Korištena je sljedeća reakcijska smjesa:

Pufer (x 10)	2,5 µl
Magnezij ($MgCl_2$)	5,0 µl
DNTP	0,5 µl
Ishodnica VitDrF	0,5 µl
Ishodnica VitDR	0,5 µl
H_2O	15,0 µl
+ DNA uzorka (ca 50ng)	1,0 µl
Taq polimeraza	0,15 µl

Ove su količine reagensa u smjesi za jedan uzorak.

SEKVENCE ISHODNICA

Za receptor vitamina D:

VitDrF: 5´ CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G 3´

VitDrR: 5´ GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC 3´

Sekvence ishodnica su preuzete iz radova (458,459).

PCR umnožak: 740 pb

Za kolagen Iα1:

COLISF: 5'- TAA CTT CTG GAC TAT TTG CGG ACT TTT TGG-3'

COLISR:5'- GTC CAG CCC TCA TCC TGG CC-3'

Podvučeni su nukleotidi koji su izmjenjeni (mismatsched) u odnosu na normalnu sekvencu gena, a radi stvaranja reznog mjesta za BalI enzim u slucaju polimorfizma G u T. Precizan opis u dijelu opisa RFLPa, vidi dalje.

Sekvence ishodnica su preuzete iz rada (460)

PCR umnožak: 254 pb

Za receptor estrogena:

ERPVF:5'- CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3'

ERPVR:3'- TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'

Sekvence ishodnica su preuzete iz rada (461)

PCR umnožak: 1,3 Kpb

UVJETI ZA LANČANU REAKCIJU POLIMERAZOM:

95 ^{o}C 5 min – početna denaturacija

94 ^{o}C 30 s – denaturacija

55 ^{o}C 1 min – vezanje ishodnica za vitDr PCR

61^{o}C 40 sek – vezanje ishodnica za ER PCR

60^{o}C 60 sek - vezanje ishodnica za ColIα1 PCR

} X 36 ciklusa

72 ^{o}C 1 min – rast lanca

72 ^{o}C 10 min – završno produljenje/sinteza nezavršenih umnožaka ciljane sekvence)

4 ^{o}C - hlađenje

POSTUPAK IZVOĐENJA PCR REAKCIJE:

Najprije treba napraviti mix koji se rastoči u PCR tubice po 24 µl . Zatim se u uzorak doda 1 µl DNA. U negativnu kontrolu se doda 1 µl MQ vode. Na kraju se u sve tubice doda TaqI polimeraza u količini od 1 µl. Potom se sve tubice stave u PCR aparat.

ELEKTROFOREZA PCR PRODUKTA U GELU AGAROZE

Korišten je gel s 2 % agaroze za VDR PCR, 1% gel za ER PCR te visokorezolucijski gel Spredex 500 (Elchrom Scientific®, Švicarska) za COL1AI PCR. Potrebna količina agaroze otopi se i zagrijava u staklenoj tikvici te joj se nakon što se djelomice ohladi, doda

jedna kap etidijevog bromida (koji se veže u DNA molekulu i vidljiv je u UV svjetlu transiluminatora). Gel se izlije u kadicu za elektroforezu i stave se dva češlja odgovarajuće veličine kako bi se napravile jažice. Nakon što gel polimerizira, izvade se češljevi i skine traka. Gel se tada uroni u sustav za elektroforezu napunjen puferom TBE. Na parafilm se aplicira 2 µl loading pufera te se uzme 5 µl PCR produkta i pomiješa se sa bojom. Zatim se uzorci nanose u jažice. U jednu jažicu nanese se DNA biljeg (0,9) koji služi za određivanje veličine fragmenta DNA.

Elektroforeza se odvija oko 25 min pri konstantnom naponu od 120 V i struji od 90mA na sobnoj temperaturi. Gelovi se pogledaju pod UV lampom te se fotografiraju u sustavu za fotografiranje.

Specifični umnožak gena za receptor vitamina D vidljiv je u obliku pruge na gelu veličine 740 pb.

UTVRĐIVANJE TaqI POLIMORFIZMA U EKSONU 9 VDR GENA

Umnožak dobiven PCR reakcijom (740 pb) izložen je djelovanju restrikcijske endonukleaze TaqI (Roche, Njemačka). Homozigotna odsutnost restrikcijskog mjesta označava se kao TT, a rezultira u 2 fragmenta od 245 i 495 pb radi postojanja obaveznog mjesta restrikcijske endonukleaze, što služi kao unutarnja kontrola.

Homozigotna prisutnost dopunskog reznog mjesta (tt) rezultira u 3 fragmenta: 205, 245 i 290 pb, dok heterozigoti imaju 4 fragmenta (205, 245, 290 i 495 pb). (Slika 6.)

Restrikcija Taq I endonukleazom izvodi se po slijedećem protokolu:

PCR umnožak	8,0 µl
TaqI restrikcijska endonukleaza (10IU/µl)	1,0 µl
Pripadajući pufer uz enzim	2,5 µl
dH_2O	13,5 µl
Ukupno	25,0 µl

Restrikcijska smjesa se inkubira na 65^0C kroz dva sata.

Nakon inkubacije se 10 µl smjese nanosi na 2% gel agaroze te nakon elektroforeze i analize na UV transiluminatoru rezultati se dokumentiraju kamerom i digitalnom slikom gela.

UTVRĐIVANJE PVUII POLIMORFIZMA U GENU ZA ESTROGENI RECEPTOR

Umnožak PCR-a (1300 pb) sadrži dio prvog introna i drugi ekson gena 1300 pb) izložen je djelovanju restrikcijske endonukleaze PVUII (Roche, Njemačka). Homozigotna odsutnost restrikcijskog mjesta označava se kao PP, a rezultira u 1 fragmenta (originalni PCR umnožak 1300 pb). Homozigotna prisutnost reznog mjesta PVU II enzima rezultira u 2 fragmenta: 880 pb i 420 pb. dok heterozigoti imaju 3 fragmenta (1300, 880 i 420 pb) (Slika 7.).

Restrikcija PVUII endonukleazom izvodi se po slijedećem protokolu:

PCR umnožak	8,0 µl
PVUII restrikcijska endonukleaza (10IU/µl)	1,0 µl
Pripadajući pufer uz enzim	2,5 µl
dH_2O	13,5 µl
Ukupno	25,0 µl

Restrikcijska smjesa se inkubira na 37^0C kroz 1 sat.
Nakon inkubacije se 10 µλ smjese nanosi na 1% gel agaroze te nakon elektroforeze i analize na UV transiluminatoru rezultati se dokumentiraju kamerom i digitalnom slikom gela.

UTVRĐIVANJE BalI POLIMORFIZMA U GENU ZA KOLAGEN Iα1

Umnožak PCR-a (255 pb) izložen je djelovanju restrikcijske endonukleaze BalI (ili MLU NI) (Roche, Njemačka). Homozigotna odsutnost restrikcijskog mjesta označava se kao SS, a rezultira u 1 fragmentu (originalni PCR umnožak 255 pb). Homozigotna prisutnost reznog mjesta BalI enzima (ss genotip) rezultira u 2 fragmenta: od 237 pb dok homozigoti imaju fragmente od 255, 237 i 18 pb. (Slika 8.)
Prikaz SP-1 veznog mjesta na genu COL1AI i konstrukcija reznog mjesta za BalI u slučaju polimorfizma G⇨T.

normalna sekvenca: nt 2041 (J03559 Genebank)..gaatg **g**gg gcg ggatg..

▼ ↓ Bal I

polifmorfna sekvenca: ..gaatg **tgg cca** ggatg..

Restrikcija BaII endonukleazom izvodi se po slijedećem protokolu:

PCR umnožak	8,0 µl
BalI restrikcijska endonukleaza (10 IU/µl)	1,0 µl
Pripadajući pufer uz enzim	2,5 µl
dH_2O	13,5 µl
Ukupno	25,0 µl

Restrikcijska smjesa inkubira se na 37^0C kroz 1 sat.

Nakon inkubacije se 10 µl smjese nanosi na visokorezolucijski gel Spredex 500 te nakon elektroforeze i analize na UV transiluminatoru rezultati se dokumentiraju kamerom i digitalnom slikom gela.

5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U analizi su korištene bivarijatne i multivarijatne metode. Ispitanice su za svaki marker bile podijeljene u tri skupine: recesivni homozigoti, heterozigoti i dominantni homozigoti.

U usporedbi više skupina korištena je analiza varijance (ANOVA). U multivarijatnoj analizi korištena je multipla regresija, koja je imala razna mjerenja koštane gustoće kao zavisnu varijablu, a kao prediktorske (nezavisne) varijable korišteni su dob, indeks tjelesne mase i tri genetska markera (VDR, COIA1, ER). Statistička analiza provedena je u programskom paketu SPSS (verzija 13.0.0), sa razinom statističke značajnosti postavljenom na $P<0,05$.

6. REZULTATI

Ispitivanje je provedeno u 45 premenopauzalnih žena s hipertireozom. Ispitivan je odnos polimorfizama TaqI gena za vitamin D receptor (TT, Tt i tt genotip), BalI gena za COLIA1 (SS, Ss i ss) i PvuII gena za estrogeni receptor (PP, Pp i pp genotip) i BMD-a u L1-L4 regiji i vratu bedrene kosti.

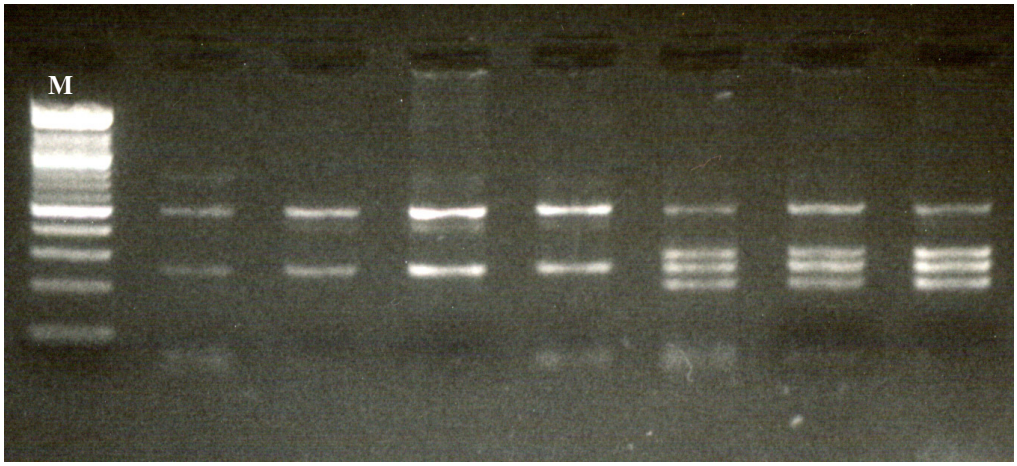
6.1. Rezultati ispitivanja genotipova

U Tablici 3. prikazane su frekvencije genotipova među ispitanicama. Frekvencija distribucije VDR genotipa bila je slijedeća: 12 (26,7%) ispitanica imalo je TT genotip, 17 (37,8 %) Tt genotip i 16 (35,6%) tt genotip. Za BalI polimorfizam COL1AI gena nađeno je 23 (51,1%) SS homozigota, 11 (24,4%) Ss heterozigota i 11 (24,4%) ss homozigota. Za PvuII polimorfizma gena za ERα nađena je slijedeća distribucija frekvencija genotipa: 13 (28,9%) ispitanica bile su PP homozigoti, 22 (48,9 %) Pp heterozigoti i 10 (22,2 %) pp homozigoti.
U slikama 6, 7 i 8 dani su primjeri reprezentativnog gela za svaki od ispitivanih polimorfizama.

Tablica 3. Frekvencije genotipova polimorfizama gena za VDR, ER i COL1AI u skupini od 45 bolesnica s hipertireozom. U tablica je prikazan broj i postotak u zagradi.

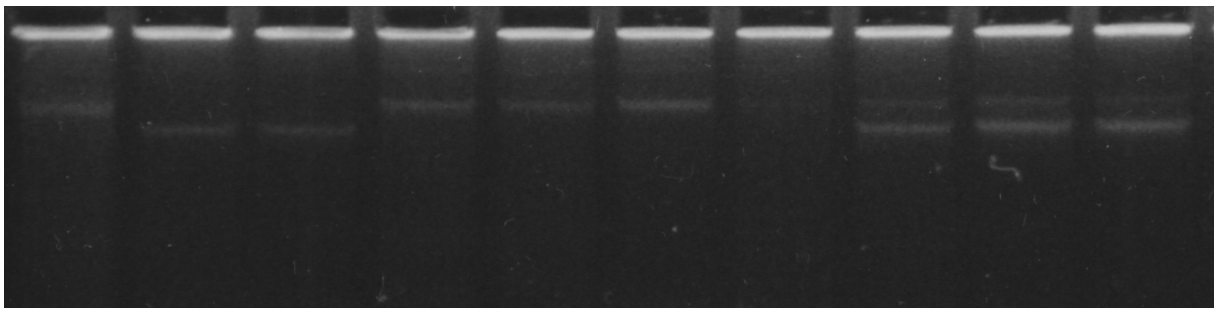
Gen	Dominantni homozigoti	Heterozigoti	Recesivni homozigoti
VDR	12 (26,7%)	17 (37,8%)	16 (35,6%)
COIA1	23 (51,1%)	11 (24,4%)	11 (24,4%)
ER	13 (28,9%)	22 (48,9%)	10 (22,2%)

Slika 6. RFLP PCR za ***TaqI*** polimorfizam gena za VDR. M – marker veličine DNA fragmenata (Roche marker V); Pruga 1: TT; 2: TT; 3: TT; 4: TT; 5: Tt; 6: Tt; 7: Tt



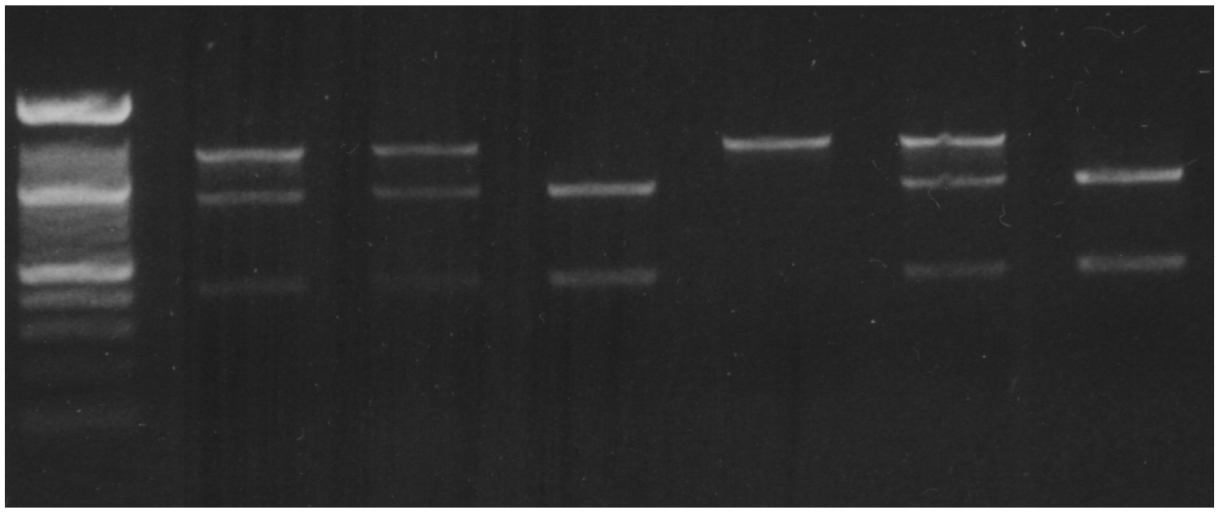
Slika 7. RFLP PCR za ***COL1AI*** polimorfizam

Genotipovi (pruge s lijeva na desno): SS;ss;ss;SS;SS;SS;SS;Ss;Ss;Ss



Slika 8. RFLP PCR za ER ***PVUII*** polimorfizam

Genotipovi (pruge s lijeva na desno): Pp;Pp;pp;PP,Pp;pp



6.2. Rezultati mjerenja mineralne gustoće kosti

Rezultati mjerenja mineralne gustoće kosti bili su normalno distribuirani na temelju Shapiro-Wilkovog testa te su u nastavku statističke obrade korišteni parametrijskih testovi (Tablica 4).

Tablica 4. Analiza distibucije rezultata denzitometrijskog mjerenja mineralne gustoće kosti pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Prikazane su aritmetičke sredine BMD-a L1-L4 regije i vrata bedrene kosti (g/cm^2), stupnjevi slobode i značajnost (P).

	Shapiro-Wilkov test		
	Vrijednost	Stupnjevi slobode	P
L1-4 BMD	0,984	45	0,409
Vrat bedrene kosti	0.981	45	0,659

Prosječan T score u ispitivanoj populaciji iznosio je -0.75 u L1-L4 regiji i -1.25 u vratu bedrene kosti, što znači da je prosječan T score vrata bedrene kosti bio u razini blaže osteopenije, a prosječan T score slabinske kralježnice bio je unutar raspona normalne koštane mase. U bolesnica s osteopenijom ili osteoporozom na najmanje jednom mjestu, prosječan T score u L1-L4 regiji iznosio je -1.05 što je graničan nalaz za osteopeniju, a u vratu bedrene kosti T score je iznosio -1.48, što je u razini blaže do umjerene osteopenije (Tablica 5).

Tablica 5. Aritmetička sredina za T score u L1-L4 regiji i vratu bedrene kosti

REGIJA	Sve ispitanice (N=45)	Ispitanice s osteopenijom ili osteoporozom (N=34)
L1-L4	- 0,75	- 1,05
Vrat bedrene kosti	- 1,25	- 1,48

Tri ispitanice (6.7%) imale su osteoporozu na najmanje 1 mjestu, a 31 ispitanica (68.9%) imala je osteopeniju. Normalnu mineralnu gustoću kosti u oba mjesta imalo je samo 11 (24.4%) od 45 ispitanica, dok su 34 (75.6%) imale smanjenu koštanu masu, odnosno osteopeniju ili osteoporozu, u jednoj ili obe regije. Mada je nešto veći broj ispitanica imao osteopeniju i osteoporozu u području vrata bedrene kosti nego u L1-L4 regiji, učestalost osteopenije i osteoporoze između ove dvije regije nije se statistički značajno razlikovala (x^2 test, p=0,420) (Tablica 6).

Tablica 6. Broj bolesnica s osteopenijom ili osteoporozom

Mineralna gustoća kosti	n	%
Normalan BMD	**11**	**24,4**
Osteopenija	**31**	**68,9**
- L1-L4	19	42,2
- vrat bedrene kosti	24	53,3
Osteoporoza	**3**	**6,7**
- L1-L4	1	2,2
- vrat bedrene kosti	2	4,4
Ukupno	**45**	**100,0**

6.3. Rezultati povezanosti ispitivanih genotipova, parametara koštane i tjelesne mase

Ispitanice s različitim genskim polimorfizmima nisu se statistički značajno međusobno razlikovale po dobi i indeksu tjelesne mase (Tablica 7).

Tablica 7 . Analize varijance za dob i ITM prema genskim polimorfizmima. Prikazane su P vrijednosti analize varijance.

Polimorfizam	Dob (P)	ITM (P)
VDR	0,131	0,328
COL1AI	0,943	0,983
ER	0,453	0,216

Između ispitanica s različitim genotipovima polimorfizama gena za receptor vitamina D, estrogeni receptor i alfa 1 lanac kolagena tipa I nisu postojale statistički značajne razlike u BMD-u slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti (Tablica 8,9,10).

Tablica 8. Analiza varijance (P) aritmetičkih sredina BMD-a (u g/cm^2) L1-L4 regije i vrata bedrene kosti u ispitanica različitih genotipova polimorfizma TaqI gena za VDR.

BMD – regija (g/m$^{2)}$	Dominantni homozigoti	Heterozigoti	Recesivni. homozigoti	ANOVA (P)
L1-4	0,97±0,14	0,94±0,11	0,98±0,11	0,678
Vrat bedrene. kosti	0,78±0,07	0,75±0,11	0,77±0,08	0,485

Tablica 9. Analiza varijance (P) aritmetičkih sredina BMD-a (g/cm^2) L1-L4 regije i vrata bedrene kosti u ispitanica različitih genotipova polimorfizma BalI gena za COL1AI.

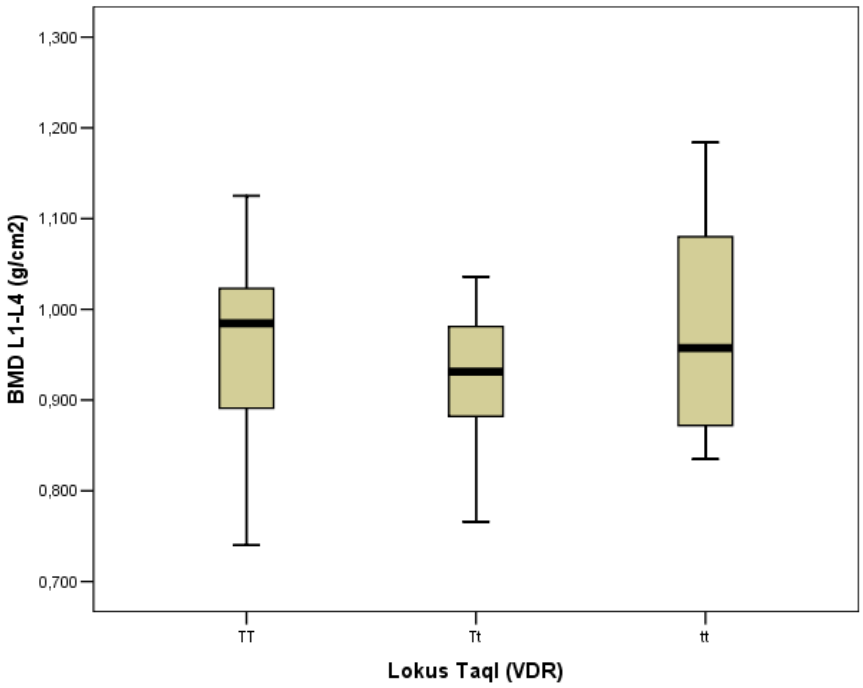
BMD – regija	Dominantni homozigoti	Heterozigoti	Recesivni homozigoti	ANOVA (P)
L1-4	0,92±0,09	1,00±0,11	0,97±0,13	0,209
Vrat bedrene kosti	0,75±0,10	0,77±0,08	0,77±0,09	0,820

Tablica 10. Analiza varijance (ANOVA, P) aritmetičkih sredina BMD-a (g/cm^2) L1-L4 regije i vrata bedrene kosti u ispitanica različitih genotipova polimorfizma PvuII gena za ERα.

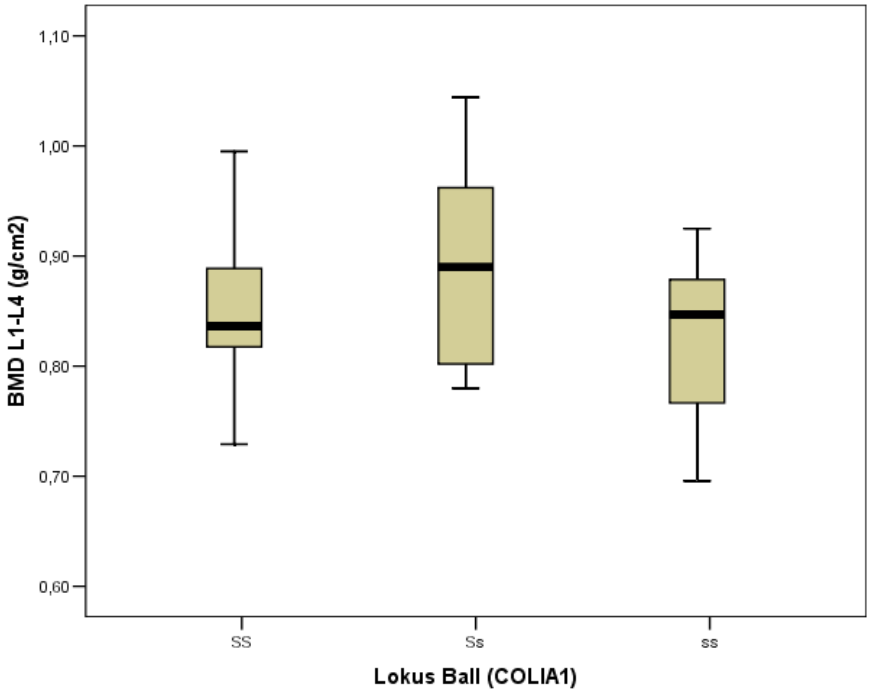
BMD – regija	Dominantni homozigoti	Heterozigoti	Recesivni homozigoti	ANOVA (P)
L1-4	0,96±0,11	0,94±0,11	1,02±0,14	0,222
Vrat bedrene kosti	0,77±0,06	0,75±0,10	0,79±0,10	0,648

Slike 9-14 prikazuju medijan, 25 i 75 percentilu, raspon najmanje i najveće vrijednosti (engl. "box and whisker plot") za rezultate mjerenja mineralne gustoće kosti (u g/cm^2) slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti prema genotipovima ispitivanih polimorfizama.
Uočava se da su podaci za mineralnu gustoću kosti podudarni za obe mjerene regije i za sve genotipove, a rasponi vrijednosti se preklapaju.

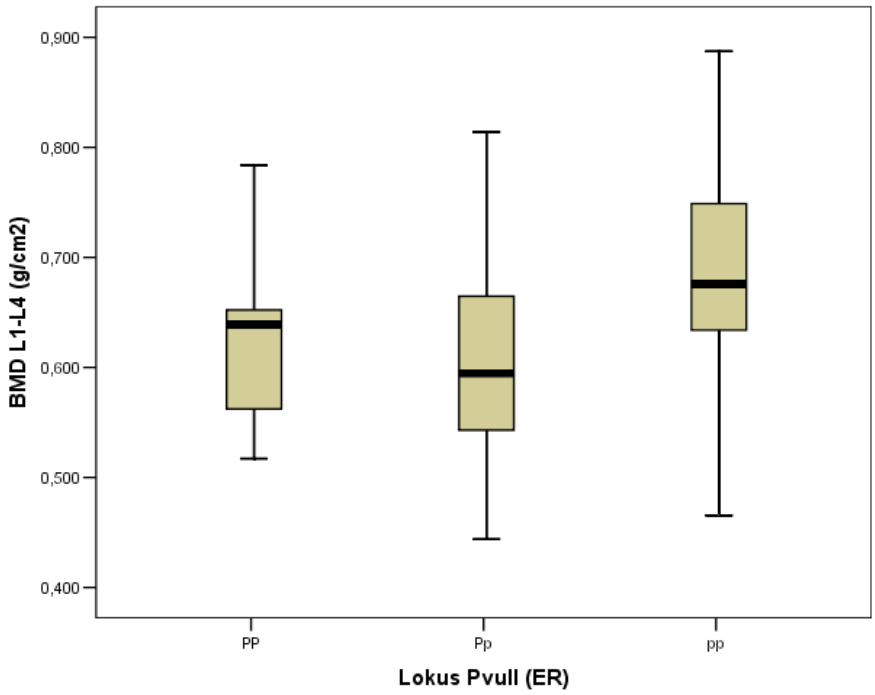
Slika 9. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) L1-L4 regije (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma Taq1 gena za VDR (TT, Tt, tt).



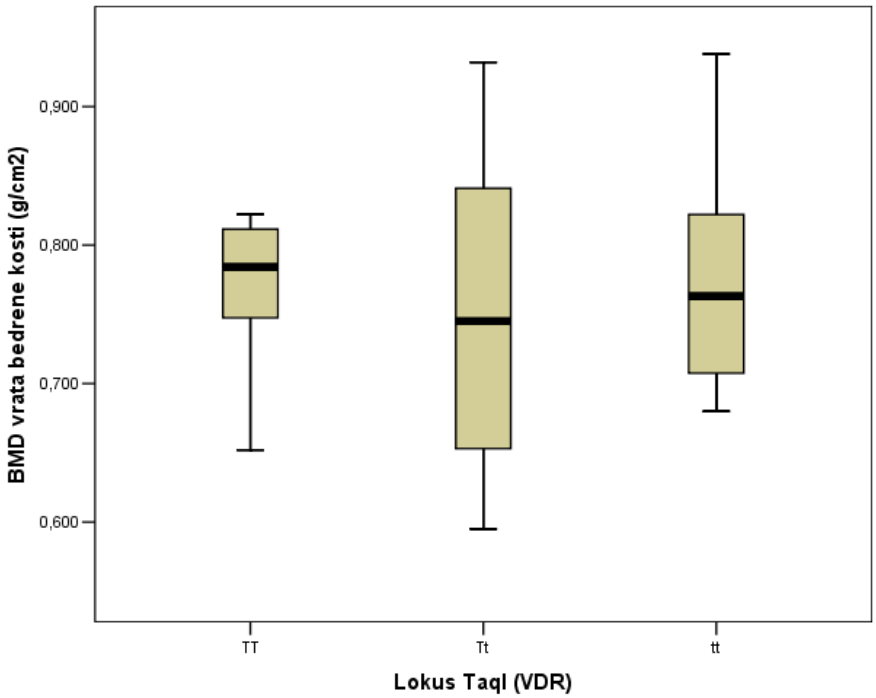
Slika 10. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) L1-L4 regije (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma BalI gena za COLIA1 (SS, Ss, ss).



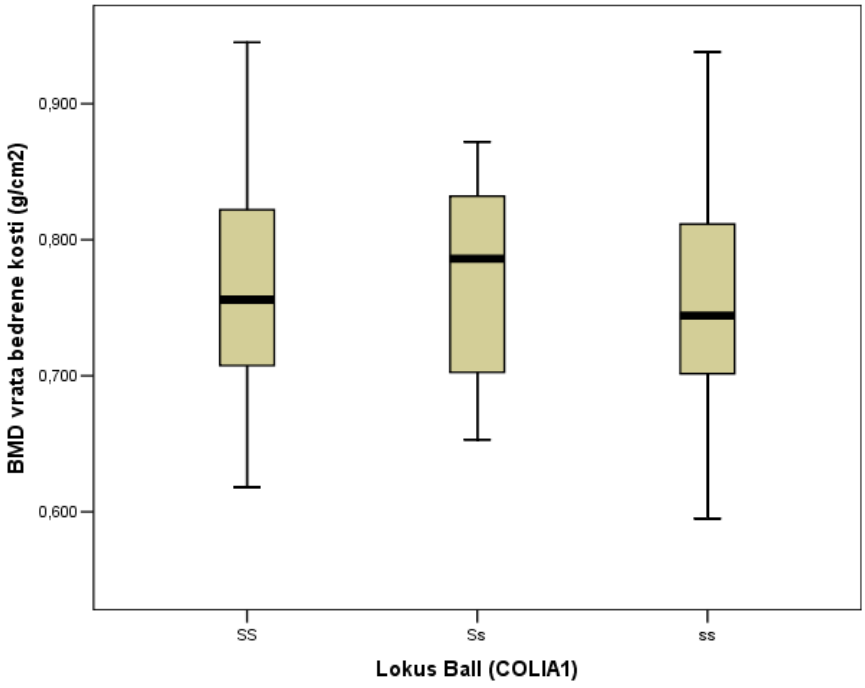
Slika 11. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) L1-L4 regije (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma PvuII gena za ER (PP, Pp, pp).



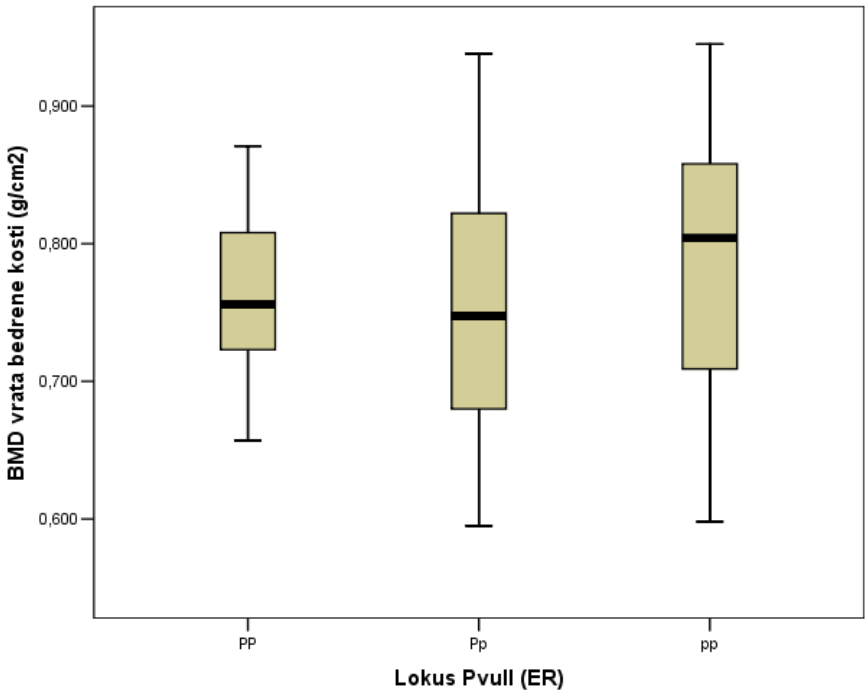
Slika 12. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) vrata bedrene kosti (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma Taq1 gena za VDR (TT, Tt, tt).



Slika 13. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) vrata bedrene kosti (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma BalI gena za COLIA1 (SS, Ss, ss).



Slika 14. Prikaz rezultata mjerenja BMD-a (g/cm^2) vrata bedrene kosti (engl. "box and whicker plot"; medijan, 25 i 75 percentila, raspon namanje i najveće vrijednosti) prema genotipovima polimorfizma PvuII gena za ER (PP, Pp, pp).



Primjenom multiple regresijske analize ispitano je i postojanje interakcije između pojedinih genskih polimorfizama. Nije ustanovljena statistički značajna povezanost ni jedne kombinacije polimorfizama gena i BMD-a ni jedne regije (Tablica 11 i 12).
U analizu su uključeni životna dob i ITM. Nije ustanovljena statistički značajna povezanost ispitivanih parametara na koštanu masu slabinske kralježnice.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja postojanja gen-gen interakcije gena za VDR, ER i COL1AI za zavisnu varijablu BMD L1-L4 regije. Korištena je multipla regresijska analiza (značajnost=P).

Varijabla	F	P
Dob	0,305	0,587
ITM	0,559	0,464
VDR	0,261	0,773
Col1A1	1,277	0,302
ER	0,595	0,561
VDR * COl1A1	0,340	0,848
VDR * ER	0,533	0,713
Col1A1 * ER	1,325	0,297
VDR * COl1A1 * ER	1,889	0,144

Tablica 12. Rezultati ispitivanja postojanja gen-gen interakcije gena za VDR, ER i COL1AI za zavisnu varijablu BMD BMD vrata bedrene kosti. Korištena je multipla regresijska analiza (značajnost=P).

Varijabla	F	P
Dob	0,141	0,711
ITM	7,256	0,014
VDR	0,757	0,483
Col1A1	0,530	0,597
ER	0,059	0,943
VDR * COl1A1	0,245	0,909
VDR * ER	0,257	0,902
Col1A1 * ER	0,288	0,882
VDR * COl1A1 * ER	0,792	0,568

Multipla linearna regresija uključila je prediktorske varijable: dob, indeks tjelesne mase i genske polimorfizme. Sukladno već učinjenim statističkim analizama, nije postojala statistički značajna povezanost ispitivanih genskih polimorfizama i navedenih prediktorskih varijabli. Ustanovljena je statistički značajna povezanost indeksa tjelesne mase i BMD-a vrata bedrene kosti ($P<0.001$), dok nije nađena statistički značajna povezanost ITM-a i BMD-a slabinske kralježnice (P=0,238) (Tablica 13).

Tablica 13. Rezultati multiple regresijske analize za zavisnu varijablu mineralne gustoće kosti slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti. Prikazani su regresijski koeficijent (β) i značajnost (P).

Regija mjerenja BMD-a	Parametar	Standardizirani regresijski koeficijent (β)	P
L1-4	Dob	-0,10	0,572
	ITM	0,20	0,238
	VDR	0,05	0,750
	Col1A1	-0,19	0,238
	ER	0,20	0,234
Vrat bedrene kosti	Dob	-0,17	0,294
	ITM	**0,53**	**0,001**
	VDR	0,01	0,925
	COl1A1	-0,09	0,551
	ER	0,11	0,460

Logističkom regresijom analizirana je povezanost genskih polimorfizama s osteopenijom i osteoporozom, ali nije ustanovljen statistički značajna povezanost nijednog od ispitivanih genskih polimorfizama s učestalošću osteopenije i/ili osteoporoze (Tablica 14).

Tablica 14. Logistička regresija polimorfizama gena za receptor vitamina D, estrogenske receptore i alfa 1 lanac kolagena tipa I s denzitometrijskim nalazom osteopenije ili osteoporoze.

	P	Exp(B)	95,0% C.I. za EXP(B)	
			Donji	Gornji
Dob	0,919	1,006	0,903	1,119
ITM	0,232	0,888	0,731	1,079
VDR	0,787	1,141	0,437	2,977
COl1A1	0,856	1,087	0,442	2,676
ER	0,194	0,500	0,176	1,422

6.4. Rezultati analize odnosa ostalih parametara

Povezanost životne dobi i BMD-a ispitana je na temelju Pearsonovog produkta momenta korelacije (Pearsonova korelacija, odnosno "Pearsonov r"). Za područje vrata bedrene kosti i slabinske kralježnice nije ustanovljena statistički značajna korelacija sa životnom dobi (Tablica 15).

Tablica 15. Korelacija životne dobi i BMD-a slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti ispitana pomoću „Pearsonovog r" .

	L1-L4 BMD	Vrat b. kosti BMD
Pearson r	0,012	0,066
P	0,940	0,664

Rezultati prethodno učinjene multiple linearne regresije, a koji su uključili zavisnu varijablu BMD L1-L4 regije i vrata bedrene kosti i prediktorske varijable ispitivanih genskih polimorfizama, životne dobi i ITM-a, pokazali su statistički značajnu povezanost indeksa tjelesne mase i BMD-a vrata bedrene kosti (P<0.001), ali ne i BMD-a slabinske kralježnice (P=0,238) (Tablica 13). Nije ustanovljena statistički značajna povezanost ITM-a s učestalošću osteopenije i osteoporoze u području vrata bedrene kosti i slabinske kralježnice (Tablica 14).

Unutar svake skupine ispitivanih polimorfizama provedena je analiza korelacija ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti pomoću Pearsonovog testa (Tablica 16). Statistički značajna povezanost ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti ustanovljena je za ispitanice koje su imale heterozigotni oblik polimorfizma gena za VDR (r=0,70, p=0,002), ali ne i za homozigote (dominantni r=0,22, P=0.485 i recesivni r=0,18, P=0,504).

U ispitanica s heterozigotnim oblikom polifmorfizama ER ustanovljena je također, statistički značajna korelacija ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti (r=0,47, P=0,027), ali ne i u ispitanica s homozigotnim oblikom polimorfizma ER (dominantni r=0,51, P=0,068, recesivni r=0,462, P=0,178)

Statistički značajna povezanost ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti nađena je i u bolesnica koje su imale homozigotni dominantni oblik polimorfizma gena za COL1AI

(r=0,61, P=0,002). Za ispitanice s drugim varijantama polimorfizma COL1AI nije ustanovljena statistički značajna povezanost ovih parametara (r=0,40, P=0,218 za heterozigote, r=0,17, P=0,612 za recesivne homozigote).

Tablica 16. Korelacija (r) ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti ispitana Pearsonovim testom korelacije u skupinama ispitanica prema genskim polimorfizmima za VDR, ER i COL1AI.

Polimorfizmi	Dominantni homozigoti			Heterozigoti			Recesivni homozigoti		
	r	N	p	r	N	p	r	N	P
VDR	0,22	12	0,485	0,70	17	0,002	0,180	16	0,504
ER	0,51	13	0,068	0,47	22	0,027	0,462	10	0,178
COL1AI	0,61	23	0,002	0,40	11	0,218	0,170	11	0,612

7. RASPRAVA

Učinjenim ispitivanjem u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom nije nađena statistički značajna povezanost polimorfizama gena za VDR (TaqI), ER (PvuII) i COL1A1 (BalI) s BMD-a u L1-L4 regiji i u vratu bedrene kosti. Također, nije nađena ni povezanost ispitivanih polimorfizama niti ITM-a s nalazom osteopenije ili osteoporoze. Od ostalih ispitivanih parametara, statistički značajna pozitivna korelacija je ustanovljena između indeksa tjelesne mase i BMD-a vrata bedrene kosti, ali ne i za BMD slabinske kralježnice. Unutar pojedinih skupina ispitivanih polimorfizama postojala je pozitivna korelacija ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom.

Ovo je prvo ispitivanje odnosa BMD-a i polimorfizama gena za VDR (TaqI), ER (PvuII) i COL1A1 (BalI) u premenopauzalnih žena s hipertireozom i stoga predstavlja izvorni znanstveni doprinos poznavanju ovog područja.

Do sada su učinjena samo 2 ispitivanja u kojima je ispitivan odnos genskih polimorfizama i BMD-a u bolesnica s hipertireozom. U njima je ispitivan utjecaj VDR gena na BMD, ali se radilo o drugim genskim polimorfizama nego u ovoj disertaciji, a ispitivanja nisu bila provedena u premenopauzalnih žena.

U jednoj od dvije studije u kojima je ispitivan odnos BMD-a i genskih polimorfizama u bolesnica s hiperitreozom, **Obermayer-Pietsch** i sur. ispitali su odnos **BsmI i FokI polimorfizama VDR** gena i BMD-a u postmenopauzalnih žena s hipertireozom (421). Našli su statistički značajnu povezanost BB genotipa s BMD-om, dok nije nađena povezanost Fok I polimorfizma s BMD-om u postmenopauzalnih žena s hipertireozom. U ispitivanju provedenom u okviru ove disertacije nije nađena povezanost Taq I polimorfizma i BMD-a u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom. Razlika u dobivenim rezultatima istraživanja skupine Obermayer-Pietsch i ove disertacije proizlazi iz drugačijeg izbora ispitivanih polimorfizama i životne dobi ispitanica.

Drugo ispitivanje učinili su **Ban** i sur. 2000. god. koji su ispitali odnos između polimorfizma **FokI gena za VDR** i BMD-a distalne trećine palčane kosti u bolesnica s Gravesovom bolešću**,** dobi od 25 do 78 godina (422). Autori nisu našli povezanost FokI polimorfizma i BMD-a u distalnoj trećini palčane kosti u grupi ispitnica u remisiji. Rezultati ukazuju da bi Ff genotip mogao biti čimbenik rizika za pojačan gubitak koštane mase u Gravesovoj bolesti, ali se taj učinak nakon 5 godina remisije gubi. Međutim, nisu ispitivane razlike u odnosu polimorfizma FokI i z-scora između premenopauzalnih i postmenopauzalnih bolesnica u remisiji. U njihovom ispitivanju i ispitivanju provedenom u okviru ove disertacije

ispitivani su različiti genski polimorfizmi. U okviru ove disertacije ispitivan je odnos Taq1 polimorfizma i BMD-a i nije nađena povezanost polimorfizma s BMD-om, a niti s rizikom nastanka osteopenije ili osteoporoze. Pri tome su se ova dva ispitivanja značajno razlikovala i po dobi ispitanica u odnosu na menopauzu i po metodama mjerenja BMD-a.

Rezultati ove disertacije najvećim dijelom su podudarni s rezultatima malobrojnih studija učinjenih u premenopauzalnih žena koje ne boluju od hipertireoze, te brojnih studija u postmenopauzalnih eutireoidnih žena, dopunjenih rezultatima meta analiza.

Za Taq polimorfizam gena za VDR rezultati disertacije podudarni su s rezultatima sve četiri studije učinjene u premenopauzalnih žena bez hipertireoze u kojima nije nađena povezanost ovog polimorfizma i BMD-a (4,344,345,383). Rezultati su također podudarni i s rezultatima četiri do sada učinjene meta-analize u kojima nije nađena povezanost TaqI polimorfizma i BMD-a u postmenopauzalnih žena s urednom funkcijom štitnjače (71,301,302,303).

Za PvuII polimorfizam gena za ER rezultati su podudarni s rezultatima 4 od 10 studija učinjenih u premenopauzalnih žena (bez posebnog osvrta na funkciju štitnjače ili eutireoidnih) u kojima nije nađena povezanost polimorfizma PvuII gena za ERα i BMD-a (235,314,336,385), dok je u 6 studija u premenopauzalnih žena nađena povezanost (317,335,338,339,343,384). Rezultati su podudarni s rezultatima meta-analiza u kojima nije nađena statistički značajna povezanost PvuII polimorfizma i BMD-a u postmenopauzalnih žena u kojih nije ispitivana funkcija štitnjače ili su bile eutireoidne (72,305).

Za BalI polimorfizam gena za COL1A1 rezultati ove disertacije podudarni su s rezultatima sve 4 studije koje su učinjene u premenopauzalnih žena (bez posebnog osvrta na funkciju štitnjače) u kojima nije nađena povezanost s BMD-om (387,388,389,390). Jedino se ne podudaraju s rezultatima meta-analiza studija u kojima je ispitivan odnos Sp1 COL1AI gena i BMD-a u postmenopauzalnih žena (bez posebnog osvrta na funkciju štitnjače ili su ispitanice bile eutireoidne) u kojima je nađena slaba povezanost ovog polimorfizma i BMD-a (koja utječe na oko 2% koštane mase) (34,306,307).

Više je mogućih uzroka uočene razlike u rezultatu ispitivanja povezanosti polimorfizma gena za COL1AI na BMD između ove disertacije provedene u premenopauzalnih hipertireoidnih bolesnica i meta-analiza provedenih u postmenopauzalnih žena bez hipertireoze (ili bez posebnog osvrta na funkciju štitnjače).

Uočena razlika može biti posljedica razlika u funkciji štitnjače i/ili dobi u odnosu na menopauzu. Ova disertacija se po tome razlikovala od dosadašnjih studija, pa su potrebna

daljnja ispitivanja u premenopauzalnih žena s hipertireozom za bolje razumijevanje genetske osnove osteoporoze u ove skupine bolesnica.

U ovoj disertaciji ispitana je dobro definirana skupina ispitanica, pažljivo odabrana na temelju specifičnih kliničkih kriterija sa svrhom postizanja najmanje moguće biološke i kliničke varijacije, a što je važna prednost upravo ovog istraživanja. To joj daje posebnu snagu u statističkom zaključivanju pred znatno većim ispitivanjima u širokoj populaciji unutar kojih se mogu naći i bolesnice s hipertireozom, ali u premalom broju da bi mogle značajnije utjecati na ukupan rezultat. Ovdje je ispitivana vrlo specifična homogena skupina koju karakterizira postojanje hipertireoze u svih ispitanica, po čemu se značajno razlikuje od opće populacije. Upravo ovaj aspekt mojeg istraživanja omogućuje određenu pouzdanost zaključivanja o povezanosti ispitivanih polimorfizama i koštane mase u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom, premda je provedeno u 45 bolesnica.

U ovom ispitivanju nađena je statistički značajna povezanost indeksa tjelesne mase i BMD-a vrata bedrene kosti za određene oblike genskih polimorfizama. To je uočeno u podskupini s dominantnim homozigotnim oblikom polimorfizma za COL1A1 (N=23), te u podskupinama s heterozigotnim oblikom polimorfizma za VDR (N=17) i ERα (N=22). Ovaj rezultat bi mogao ukazivati da se mehanizmi regulacije koštanog sustava razlikuju ovisno o osobitostima polimorfizama gena istraživanih u ovoj disertaciji, uz oprez tumačenja ovog rezultata zbog malog broja ispitanica u podskupinama. Rezultati dosadašnjih ispitivanja o povezanosti ITM-a i BMD-a su kontradiktorni. Duncan i sur. nalaze povezanost ITM-a i BMD-a slabinske kralježnice (ali bez razdvajanja ispitanica u pre- i postmenopauzalne grupe) (201). Chen i sur. nalaze povezanost ITM-a i BMD-a samo u postmenopauzalnih bolesnica koje su bile na dugotrajnoj tiroksinskoj supresivnoj terapiji (202). Nije nađena povezanost ITM-a i BMD-a slabinske kralježnice, niti ITM-a i rizika osteopenije i osteoporoze u ovih bolesnica. Drugi autori ne nalaze povezanost ITM-a i BMD-a u ovih bolesnica (203,204,205,462).

BMD premenopauzalnih eutiroidnih žena dominantno je povezan s „mršavom“ tjelesnom masom, dok u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom ovaj odnos nije ispitivan, pa nije poznato postoje li razlike u utjecaju strukture tijela na BMD između premenopauzalnih eutireoidnih žena i premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom (210,239,241). Do sada je učinjeno više ispitivanja u kojima je nađena zajednička genetska osnova ukupne mase masnog tkiva i BMD-a u eutireoidnih osoba (226,227,228,229,230,231,231), ali nije nađena zajednička genetska osnova „mršave“

tjelesne mase i BMD-a. Kitamura i sur. našli su da polimorfizam ERα (PvuII) u postmenopauzalnih žena modificira učinak „mršave“ tjelesne mase na BMD vrata bedrene kosti, ali ne modificira i utjecaj „mršave“ tjelesne mase na BMD slabinske kralježnice (235). U premenopauzalnih žena i muškaraca nije nađena ovakva interakcija.

Hipertireoza je u premenopauzalnih žena povezana s prolaznim smanjenjem ITM-a i BMD-a (158,159,160,161,163,164). Na osnovu dosadašnjih studija zna se da hipertireoza na različite načine djelovanjem hormona štitnjače ili nedostatkom TSH djeluje direktno na kost i uzrokuje smanjenje BMD-a (170,171,172,173,174,175). Do sada nije značajnije ispitivan utjecaj hipertireoze na smanjenje BMD-a povezan sa smanjenjem ITM-a uzrokovanim hipertireozom. Van der Deure i sur. pokazali su da je u eutireoidnih osoba starije dobi TSH pozitivno povezan s BMD-om i da se ta veza odvija dijelom i preko ITM-a (173). Mazokopakis i sur. nalaze u premenopauzalnih bolesnica koje su 4 godine bile na tireosupresivnoj terapiji smanjenje ITM-a, ali ne i BMD-a, pa ne nalaze ni povezanost ITM-a i BMD-a (204). Također, malo se zna o utjecaju hipertireoze na moguće promjene strukture tijela i distribucije masnog tkiva, jer do sada nije bilo takvih ispitivanja, pa nije moguće procijeniti niti učinak mogućih promjena na BMD u ovih bolesnica. Još manje se zna o mogućoj genetskoj pozadini ovih odnosa. Do sada nije učinjeno nijedno ispitivanje mogućeg utjecaja genskih polimorfizama na odnos ITM-a i BMD-a u bolesnica s hipertireozom.

U ovom ispitivanju nije nađen utjecaj dobi na BMD, kao što se i očekivalo, jer dob u premenopauzalnih žena još ne pokazuje značajan učinak na BMD.

Potrebno je istaknuti da do sada nije ispitivan odnos polimorfizama gena za receptor vitamina D, estrogeni receptor i alfa 1 lanac kolagena tipa I u žena s hipertireozom u premenopauzalnom periodu i BMD-a. Stoga rezultati ovog istraživanja predstavljaju originalni znanstveni doprinos poznavanju regulacije koštanog metabolizma u hipertireozi i razjašnjavanju čimbenika rizika osteoporoze u premenopauzalnih žena. Ovo je također, prvo ispitivanje u kojem je ispitivana povezanost ovih genskih polimorfizama s odnosom indeksa tjelesne mase i BMD-a u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom i stoga predstavlja izvorni znanstveni doprinos i u tom području. Ovi rezultati ukazuju na složenost međuodnosa genetskog ustroja, hormonskog statusa (hormona štitnjače, estrogena i drugih), osobitosti građe tijela, koštanog sustava, ali i drugih čimbenika.

Bilo bi korisno učiniti slično ispitivanje i u postmenopauzalnih bolesnica s hipertireozom, ali u većeg broja ispitanica, u kojem bi se ispitao odnos ovih istih polimorfizama, TaqI gena za VDR, BalI gena za COL1A1 i PvuII gena za ER i BMD-a

slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti, te prijeloma kosti, jer nedostaju podaci o ovoj podskupini bolesnica.

Također, korisno bi bilo učiniti slično ispitivanje u većeg broja premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom s ispitivanjem utjecaja polimorfizama TaqI gena za VDR, BalI gena za COL1A1 i PvuII gena za ERα na promjene strukture tijela i na odnos strukture tijela i BMD-a. Rezultati takvog ispitivanja mogli bi doprinijeti boljem poznavanju mehanizama kojima hipertireoza utječe ne samo na ITM nego i na strukturu tijela i kao i na BMD, s posebnim doprinosom rasvjetljavanju uloge genetskih čimbenika u tom složenom procesu.

8. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja povezanosti polimorfizama gena za receptor vitamina D, estrogeni receptor i alfa-1lanac kolagena tipa I s BMD-om 45 bolesnica s hipertireozom premenopauzalne dobi može se zaključiti sljedeće:

- nije ustanovljena statistički značajna povezanost polimorfizma TaqI gena za receptor vitamina D i BMD-a slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti;
- nije ustanovljena statistički značajna povezanost polimorfizma BalI Sp1 regije gena za COLIA1 i BMD-a slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti;
- nije ustanovljena statistički značajna povezanost polimorfizma PvuII gena za estrogeni receptor i BMD-a slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti;
- također nije ustanovljena statistički značajna povezanost zajedničkog učinka; polimorfizama za sva tri ispitivana gena s BMD-om slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti;
- za iste ispitivane genske polimorfizme nije postojala statistički značajna povezanost s učestalošću osteopenije ili osteoporoze;
- geni za receptor vitamina D, estrogeni receptor i alfa 1 lanac kolagena tipa I vjerovatno nisu rizični čimbenici nastanka osteoporoze u bolesnica s hipertireozom u premenopauzalnom periodu života;
- ustanovljena je pozitivna korelacija indeksa tjelesne mase i BMD-a vrata bedrene kosti u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom, dok nije nađena povezanost s BMD-om slabinske kralježnice;
- u ispitanica koje su bile heterozigoti za polimorfizam TaqI (Tt) gena za receptor vitamina D postojala je statistički značajna korelacija BMD-a vrata bedrene kosti i ITM-a;
- u ispitanica s nalazom dominantnog homozigotnog polimorfizma BalI gena za COLIA1 (SS) postojala je statistički značajna korelacija BMD-a vrata bedrene kosti i ITM-a;
- u ispitanica s nalazom heterozigotnog polimorfizma PvuII gena za ER (Pp) postojala je statistički značajna korelacija BMD-a vrata bedrene kosti i ITM-a.

9. SAŽETAK

Hipertireoza je poznati čimbenik rizika za nastanak sekundarne osteoporoze. Malo se zna o genetskoj podlozi nastanka osteoporoze u bolesnika s hipertireozom. Ovo je prvo ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za VDR (TaqI), ERα (PvuII) i COLIA1 (BalI) u bolesnica premenopauzalne dobi s hipertireozom i BMD-a. Ispitivanje je učinjeno u 45 ispitanica u premenopauzi (40,4±7,7 godina). BMD je mjeren DXA metodom u L1-L4 regiji i vratu bedrene kosti, a rezultati su pokazali osteoporozu u 3, a osteopeniju u 31 bolesnice. Multiregresijskom analizom nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizama bilo kojeg od ova tri gena, niti pojedinačno, niti u kombinaciji, s BMD-om slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti, odnosno nalazom osteopenije ili osteoporoze.
Ustanovljena je povezanost ITM-a i BMD-a vrata bedrene kosti u bolesnica koje su bile heterozigoti polimorfizma Taq1 gena za VDR i PvuII gena za ER, te dominantni homozigoti polimorfizma BalI gena za COL1AI. ZAKLJUČAK: Nije ustanovljena povezanost polimorfizama TaqI gena za VDR, PvuII gena za ERα i BalI gena za COLIA1 s BMD-om slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti, kao ni s osteopenijom i osteoporozom u premenopauzalnih bolesnica s hipertireozom.

10. SUMMARY

Hyperthyroidism is a recognised risk factor for secondary osteoporosis. Little is known about the genetic origin of osteoporosis in patients with hyperthyroidism. This is the first study to examine the association between polymorphism of the VDR (TaqI), ERalpha (PvuII), COLIA1 (BalI) genes and BMD in premenopausal women with hyperthyroidism. This study comprised 45 premenopausal women, with the average age 40,4±7,7 years. The BMD was measured in using dual X-ray absorptiometry (DXA) in the L1-L4 region of the spine and femoral neck. Multivariate analysis found no significant correlation between polymorphisms of the 3 selected genes, individually or in combination, and BMD at the lumbar spine and femoral neck, and no correlation between polymorphisms and osteoporosis and osteopenia. A relationship was found between body mass index (BMI) and BMD at femoral neck in patients heterozygous for Taq1 polymorphism of the VDR gene and PvuII polymorphism of the ER gene, and homozygous for BalI polymorphism of the COL1AI. CONCLUSION: A statistically significant association was not found between TaqI polymorphism of the VDR gene, PvuII polymorphism of the ERalpha gene and BalI polymorphism of the COLIA1 gene and BMD at the lumbar spine and femoral neck in hyperthyroid premenopausal women.

The Association of Polymorphisms of the Vitamin-D Receptor Gene, Collagen Type I Alpha-1 Gene and Estrogen Receptor Gene and Bone Mineral Density in Patients with Hyperthyroidism

Jozo Jelčić

2008.

11. LITERATURA

1. MacDonald HM, McGuigan FEA, New SA, Campbell MK, Golden MHN, Ralston SH, Reid DM. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts early perimenopausal spinal bone loss. J. Bone Miner Res 2001;16:1634-1641.
2. Nguyen TV and Eisman JA. Genetics of fracture: challenges and opportunities. J. Bone Miner Res 2000;15:1253-1256.
3. Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P, Tsalamandris C. Do genetics factors contribute to associations between muscle strength, fat-free mass and bone density? A twin study. Am J Physiol Endocrinol Metab 1996;270:E320-E327.
4. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Shristian JC, Johnston Jr CC. Genetic factors in determining bone mass. J Clin Invest 1973;52:2800-2808.
5. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Fang Y, McGuigan FEA, Grant SFA, Hofman A, van Leeuwen JPTM, Pols HAP, Ralston SH. Relation of alleles of the collagen Type 1α1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. N Engl J Med 1998;1016-1021.
6. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. J Bone Miner Res 1995;10:1283-1288.
7. Graafmans WC, Lips P, Ooms ME, van Leeuwen JPTM, Pols HAP. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptro genotiype. J Bone Miner Res 1997;12:1241-1245.
8. Heegard A, Jorgensen HL, Vestergaard AW, Hassager C, Ralston SH. Lack of influence of collagen type 1α1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal Danish women followed for 18 years. Calcif Tissue Int 1996;66:409-413.
9. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. J Bone Miner Res 2000;2222-2230.
10. Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, 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;77-82.

11. Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Nakauchi K, Miki N, Mizuno M, Harada A. Association of a polymorphism of the transforming growth factor β-1 gene with prevalent vertebral fractures in Japanese women. Am J Med 2000;109:244-247.
12. Moller M, Horsman A, Harvald B, Hauge M, Henningsen K, Nordin BEC. Metacarpal morphometry in monozygotic and dizygotic elderly twins. Calcif Tiss Res 1978;25:197-201.
13. Pocock NA, Eisman JA, Hoppeer JL, Yeates MG, Sambrook PN, Ebert S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. J Clin Invest 1987;80:706-710.
14. Dequeker J, Nijs N, Verstraeten A, Geusens P, Gevers G. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: a twin study. Bone 1987;8:207-209.
15. Slemenda CW, Christian JC, Wiliams CJ, Wiliams CJ, Norton JA, Johnston Jr CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. J Bone Miner Res 1991;6:561-567.
16. Klein OF, Carlos AS, Vartanian KA et al. Confirmation and fine mapping of chromosomal regions influencing peak bone mass in mice. J Bone Miner Res 2001;16:1953-1961.
17. Dunn IC, Fleming RH, McCormack HA, Morrice D, Burt DW, Preisinger R, Whitehead CC. A QTL for osteoporosis detected in an F2 population derived from White Leghorn chicken lines divergently selected for bone index. Anim Genet. 2007 Feb;38(1):45-49.
18. Hsu YH, Xu X, Terwedow HA et al. Large-scale genome-wide linkage analysis for loci linked to BMD at different skeletal sites in extreme selected sibships. J Bone Miner Res. 2007 Feb;22(2):184-194.
19. Streeten EA, McBride DJ, Pollin TI et al. Quantitative trait loci for BMD identified by autosome-wide linkage scan to chromosomes 7q and 21q in men from the Amish Family Osteoporosis Study. J Bone Miner Res. 2006 Sep;21(9):1433-1442.
20. Cheung CL, Huang QY, Ng MY, Chan V, Sham PC, Kung AW. Confirmation of linkage to chromosome 1q for spine bone mineral density in southern Chinese. Hum Genet. 2006 Oct;120(3):354-9.
21. Chen XD, Shen H, Lei SF, Li MX, Yang YJ, Deng HW. Exclusion mapping of chromosomes 1, 4, 6 and 14 with bone mineral density in 79 Caucasian pedigrees. Bone. 2006 Mar;38(3):450-5.

22. Peacock M, Koller DL, Lai D, Hui S, T, Econs MJ. Sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone structure at the proximal femur in men. Bone. 2005 Oct;37(4):467-473.
23. Gong Y, Slee RB, Fukai N et al. The Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell 2001;107:513-545.
24. Lau HH, Ng MY, Cheung WM, Paterson AD, Sham PC, Luk KD, Chan V, Kung AW. Assessment of linkage and association of 13 genetic loci with bone mineral density. J Bone Miner Metab 2006;24(3):226-234.
25. Demissie S, Dupuis J, Cupples LA, Beck TJ, Kiel DP, Karasik D. Proximal hip geometry is linked to several chromosomal regions: genome-wide linkage results from the Framingham Osteoporosis Study. Bone 2007 Mar;40(3):743-50.
26. Deng FY, Xiao P, Lei SF, et. al. Bivariate whole genome linkage analysis for femoral neck geometric parameters and total body lean mass. J Bone Miner Res 2007 Jun;22(6):808-816.
27. Jiang H, Lei SF, Xiao SM, et al. Association and linkage analysis of COL1A1 and AHSG gene polymorphisms with femoral neck bone geometric parameters in both Caucasian and Chinese nuclear families. Acta Pharmacol Sin 2007 Mar;28(3):375-381.
28. Ioannidis JP, Ng MY, Sham PC, et al. Meta-analysis of genome-wide scans provides evidence for sex- and site-specific regulation of bone mass. J Bone Miner Res 2007 Feb;22(2):173-83.
29. Ralston SH, Galwey N, Mackay I, et al. Loci for regulation of bone mineral density in men and women identified by genome wide linkage scan: The FAMOS study. Hum Mol Genet 2005 14: 943–951.
30. Kammerer CM, Schneider JL, Cole SA, Quantitative trait loci on chromosomes 2p, 4p, and 13q influence bone mineral density of the forearm and hip in Mexican Americans. J Bone Miner Res. 2003 Dec;18(12):2245-2252.
31. Karasik D, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP. Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham Study. Bone. 2003 Sep;33(3):308-316.
32. Koller DL, Liu G, Econs MJ, et al. Genome screen for quantitative trait loci underlying normal variation in femoral structure. J Bone Miner Res. 2001 Jun;16(6):985-991

33. Shen H, Long JR, Xiong DH, et al. Mapping quantitative trait loci for cross-sectional geometry at the femoral neck. J Bone Miner Res. 2005 Nov;20(11):1973-1982.
34. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, et al. Large scale evidence for the effect of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: The GENOMOS study. PLoS Med. 2006 Apr;3(4):e90.
35. Krall EA, Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. J Bone Miner Res 1993 Jan;8(1):1-9.
36. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. J Bone Miner Res. 1995 Dec;10(12):2017-2022.
37. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. J Bone Miner Res 1996;11:530-534.
38. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in health families. J Bone Miner Res 1995;12:2017-2022.
39. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M, Christian JC, Sorbel J, Hui SL, Johnston CC. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. Osteoporosis int 1996;6:178-182.
40. Williams FM, Spector TD. Recent advances in the genetics of osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006 Jan-Mar;6(1):27-35.
41. Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken RJ, Rimpela M, Rose RJ. Common genetic influences on BMI and age at menarche. Hum Biol 1995;67:739-753.
42. Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genes control the cessation of a woman 's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:1875-1880.
43. Hunter D, de Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, Spector TD. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. J Bone Miner Res 2001;16:371-378.
44. Salmén T, Heikkinen AM, Mahonen A, et al. Relation of estrogen receptor-alpha gene polymorphism and hormone replacement therapy to fall risk and muscle strength in early postmenopausal women. Ann Med 2002;34(1):64-72.

45. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS et al. Risk factors for hip fracture in women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group N Engl J Med 1995;332:767-773.
46. TorgensonDJ, Campbell MK, Thomas RE, Reid DM. Prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors. J Bone Miner Res 1996;11:293-297.
47. Fox KM, Cummings SR, Powell-Threets K, Stone K. Family history and risk of osteoporotic fracture. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoporos Int 1998;8:557–562.
48. Keen RW, Hart DJ, Arden NK, Doyle DV, Spector TD. Family history of appendicular fracture and risk of osteoporosis: a population-based study. Osteoporos Int 1999;10:161–166.
49. Van der Voort DJ, Geusens PP, Dinant GJ. Risk factors for osteoporosis related to their outcome: fractures. Osteoporos Int 2001;12:630–638.
50. Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. JAMA 2001;286:2815–2822.
51. Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Rodriguez-Rebollar A, Cannata-Andia JB. Determinants of incidence of osteoporotic fractures in the female Spanish population older than 50. Osteoporos Int 2005;16:2013–2017.
52. Deng HW, Chen WM, Recker S et al. Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture. J Bone Miner Res 2000;15:1243-1252.
53. MacGregor A, Snieder H, Spector TD. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people. Twin data support genetic contribution to risk of fracture. BMJ. 2000 Jun 17;320(7250):1669-1670.
54. Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4829–4835
55. Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant SF, Center JR, Gardiner EM, Eisman JA. Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:6575–6579

56. van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, Colin EM, Fang Y, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. Association of 5′ estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. Hum Mol Genet 2003;12:1745–1754
57. Deng HW, Mahaney MC, Williams JT, Li J, Conway T, Davies KM, Li JL, Deng H, Recker RR. Relevance of the genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. Genet Epidemiol 2002;22:12–25.
58. Andrew T, Antioniades L, Scurrah KJ, Macgregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. J Bone Miner Res 2005;20:67–74.
59. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. N Engl J Med 1995;332:767–773.
60. Bauer DC, Browner WS, Cauley JA, Orwoll ES, Scott JC, Black DM, Tao JL, Cummings SR. Factors associated with appendicular bone mass in older women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Ann Intern Med 1993;118:657–665.
61. Orwoll ES, Bauer DC, Vogt TM, Fox KM. Axial bone mass in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Ann Intern Med 1996;124:187–196.
62. Brot C, Jensen LB, Sorensen OH. Bone mass and risk factors for bone loss in perimenopausal Danish women. J Intern Med 1997;242:505–511.
63. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, De Laet C, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, III, Pols HA, Reeve J, Silman AJ, Tenenhouse A. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. Bone 2004;35:1029–1037.
64. Kannus P, Palvanen M, Kaprio J, Parkkari J, Koskenvuo M. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of a nationwide cohort of elderly Finnish twins. BMJ. 1999 Nov 20;319(7221):1334-1337.
65. Deng HW, Mahaney MC, Williams JT et al. Relevance of the genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. Genet Epidemiol 2002;22:12–25.
66. Andrew T, Antioniades L, Scurrah KJ, Macgregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. J Bone Miner Res 2005;20:67–74.

67. Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4829–4835.
68. Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant SF, Center JR, Gardiner EM, Eisman JA. Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:6575–6579
69. Van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, et al. Association of 5′ estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. Hum Mol Genet 2003;12:1745–1754
70. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q et al. Relation of alleles of the collagen type I α 1 gene to bone density and risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. N Engl J Med. 1998;338:1016–1022.
71. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML et al. GENOMOS Study. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. Ann Intern Med 2006 Aug 15;145(4):255-264.
72. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennet et al. GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. JAMA 2004 Nov 3;292(17):2105-2114.
73. Van Meurs JB, Rivadeneira F, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. J Bone Miner Res 2006 Jan;21(1):141-150.
74. Seeman E. Pathogenesis of osteoporosis. J Appl Physiol 2003;95:2142-2151.
75. Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. Lancet. 2003 Feb 15;361(9357):567-71.
76. Schapira D, Schapira C. Osteoporosis: the evolution of a scientific term. Osteoporos Int. 1992 Jul;2(4):164-167.
77. Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1991;90:107–110.
78. Consensus Development Conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993;94:646-650

79. World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its implication to screening for postmenopausal osteoporosis: Technical report series 843. Geneva: WHO,1994.
80. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. Lancet 2002;359:1841-1850.
81. Ferrari S, Rizzoli R, Bonjour JPh. Genetics aspects of osteoporosis. Curr Opin Rheumatol 1999;11(4):294-306.
82. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. South Med J. 2001 Jun;94(6):569-573.
83. Naganathan V, Jones G, Nash P, Nicholson H, Eisman J, Sambrook P. Vertebral fracture risk with long-term corticosteroid therapy. Arch Intern Med 2000 Oct 23;160:2917-2922.
84. Siffledeen JS, Siminoski K, Jen H, Fedorak RN. Vertebral fractures and role of low bone mineral density in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2007 Jun;5(6):721-728.
85. Cummings SR, Karpf DB, Harris F et al. Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. Am J Med 2002;112:281-289.
86. Stone KL, Seeley DG, Lui Ly, et al. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. J Bone Miner Res 2003;18:1947-1954.
87. Peacock M, Turner H, Econs MJ, Foroud T. Genetisc of osteoporosis. Endocr Rev 2002;23(3):303-326.
88. Rittweger J, Gunga HC, Felsenberg D, Kirsch KA. Muscle and bone-aging and space. J Gravit Physiol 1999 Jul;6(1):P133-136.
89. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. J Musculoskelet Neuronal Interact 2001 Mar;1(3):263-274.
90. Benjamin M, Hillen B.Mechanical influences on cells, tissues and organs - 'Mechanical Morphogenesis'.Eur J Morphol 2003 Feb;41(1):3-7.
91. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. Mech Ageing Dev 2003 Mar;124(3):269-79.

92. Melton LJ III, Kan SH, Frye MA, et al: Epidemiology of vertebral fractures in women. Am J Epidemiol 1989; 129:1000-1011.
93. Melton LJ III. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives.J Bone Miner Res. 2000 Dec;15(12):2309-2314.
94. Lauritzen JB. Hip fractures: incidence, risk factors, energy absorption, and prevention. Bone. 1996 Jan;18(1 Suppl):65S-75S.
95. Elffors L: Osteoporotic fractures due to osteoporosis. impacts of a frailty pandemic in an aging world. Aging (Milano) 1998; 10:191-204
96. Ismail AA, O'Neill TW, Cooper C et al (1998) Mortality associated with vertebral deformity in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). Osteoporos Int 8:291–297.
97. Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, Nevitt MC, Kado DM, Hochberg MC, Santora AC, Black DM (2000) Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. J Am Geriatr Soc 48(3):241–249.
98. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. 98 J Bone Miner Res. 1993 Sep;8(9):1137-1148.
99. Eastell R, Cedel SL, Wahner HW, et al. Classification of vertebral fractures. J Bone Miner Res 1991;6:207–215.
100. Melton LJ, Lane AW, Cooper C et al. Prevalence and incidence of vertebral deformities. Osteoporos Int 1993;3:113–119.
101. McCloskey EV, Spector TD, Eyres KS, et al. The assessment of vertebral deformity: a method for use in population studies and clinical trials. Osteoporos Int 1993;3:138–47.
102. Hedlund LR, Gallagher JC. Vertebral morphometry in diagnosis of spinal fractures. Bone Miner. 1988 Oct;5(1):59-67.
103. Minne HW, Leidig G, Wuster C, et al. A newly developed spine deformity index (SDI) to quantitate vertebral crush fractures in patients with osteoporosis. Bone Miner 1988;3:335–349.
104. Black DM, Cummings SR, Stone K, Hudes E, Palermo L, Steiger P. A new approach to defining normal vertebral dimensions. J Bone Miner Res 1991;6:883–892.
105. Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, et al. (2001) Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. JAMA 286:2815.

106. Lindsey R, Pack S and Li Z (2005) Longitudinal progression of fracture prevalence through a population of postmenopausal women with osteoporosis. Osteoporos Int 16:306.
107. Pećina M, Smoljanović T, Cicvara-Pećina T, Tomek-Roksandić S. Osteoporosis fractures in the elderly. Arh Hig Rada Toksikol 2007 Mar;58(1):41-47.
108. Ismail AA, Cooper C, Felsenberg D, Varlow J, Kanis JA, Silman AJ, O'Neill TW. Number and type of vertebral deformities: epidemiological characteristics and relation to back pain and height loss. European Vertebral Osteoporosis Study Group. Osteoporos Int. 1999;9(3):206-213.
109. Ismail AA, Cockerill W, Cooper C et al. Prevalent vertebral deformity predicts incident hip though not distal forearm fracture: results from the European Prospective Osteoporosis Study.Osteoporisis Int 2001;12(2):85-90.
110. Cooper C, O'Neill T, Silman A. The epidemiology of vertebral fractures. European Vertebral Osteoporosis Study Group. Bone. 1993;14 Suppl 1:S89-97.
111. Roy DK, Pye SR, Lunt m et al. European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group. Falls explain between-center differences in the incidence of limb fracture across Europe. Bone. 2002 Dec;31(6):712-717.
112. Kaptoge S, Benevolenskaya LI, Bhalla AK et al. Low BMD is less predictive than reported falls for future limb fractures in women across Europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study. Bone. 2005 Mar;36(3):387-398.
113. Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kroger H, Komulainen M, Saarikoski S, Honkanen R, Partanen J, Maenpaa PH. Relation of estrogen receptor-alpha gene polymorphism and hormone replacement therapy to fall risk and muscle strength in early postmenopausal women. Ann Med. 2002;34(1):64-72.
114. Deng HW, Mahaney MC, Williams JT, Li J, Conway T, Davies KM, Li JL, Deng H, Recker RR. Relevance of the genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. Genet Epidemiol 2002;22:12–25.
115. Andrew T, Antioniades L, Scurrah KJ, Macgregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. J Bone Miner Res 2005;20:67–74.
116. Carani C, Qin K, Simoni M et al. Effects of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. New England Journal of Medicine 1997; 337: 91–95.

117. Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR and Simpson ER. A syndrome of female pseudohermaphrodism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). J Clin Endocrinol Metab 1994;78:1287–1292.
118. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C and Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. J Clin Endocrinol and Metabol 1995;80:3689–3698.
119. Bulun SE. Aromatase deficiency in women and men: would you have predicted the phenotype? J Clin Endocrinol Metab 1996;81:867–871.
120. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P and Harada H. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new points mutation in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries and bone densitometry in childhood. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:1739–1745.
121. Deladoëy J, Flück C, Bex M, Yoshimura N, Harada N, Mullis PE. Aromatase deficiency caused by a novel P450arom gene mutation: impact of absent estrogen production on serum gonadotropin concentration in a boy. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:4050–4054.
122. Herrmann BL, Saller B, Janssen OE et al. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:5476–5484.
123. Pura M et al. Clinical findings in an adult man with a novel mutation in the aromatase gene. In 85th Annual Meeting, The Endocrine Society, Philadelphia, USA 2003.
124. Bouillon R, Bex M, Vanderschueren D, Boonen S. Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:6025–6029.
125. Maffei L, Murata Y, Rochira V et al. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:61–70.
126. Ockrim JL, Lalani EN, Banks LM, et al. Transdermal estradiol improves bone density when used as single agent therapy for prostate cancer. J Urol. 2004 Dec;172(6 Pt 1):2203-2207.
127. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. Osteoporos Int 2005;16:155.

128. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. Osteoporos Int 2005;16:737.
129. Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study. Bone 2003 Jan;32(1):78-85.
130. Painter SE, Kleerekoper M, Camacho PM. Secondary osteoporosis: a review of the recent evidence. Endocr Pract. 2006 Jul-Aug;12(4):436-445.
131. Osteoporosis. NIH Consens Dev Conf Consens Statement 1984 Apr 2-4; 5(3):1-6.
132. Riggs BL, Melton LJ III. Involutional osteoporosis. N Engl J Med. 1986;314:1676-1686.
133. Lian JB, Stein GS, Canalis E, et al. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: Favus MJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
134. Kato, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol 2002;157,303–314.
135. Koay MA, Brown MA. Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton. Trends Mol Med 2005 Mar;11(3):129-137.
136. Koay, M.A. et al. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. J. Bone Miner Res 2004;19, 1619–1627.
137. Koay, M. et al. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. J. Bone Miner Res 2004;19, 1619–1627.
138. Ferrari, S.L. et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. Am J Hum Genet 2004;74, 866–875.
139. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclast biology. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. Osteoporosis. San Diego, Calif: Academic Press; 1996.
140. Hershey CL, Fisher DE 2004 Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. Bone 34:689–696.
141. Lian JB, Stein GS, Canalis E, et al. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: Favus MJ, ed. Primer on the

Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

142. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Third Edition, Lippincot-Raven, Philadelphia . New York, 1996.
143. Kuiper JW, Van Kuijk C, Grashuis JL. Distribution of trabecular and cortical bone related to geometry. A quantitative computed tomography study of the femoral neck. Invest Radiol. 1997 Feb;32(2):83-9.
144. Einhorn TA. The bone organ system: form and function. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. Osteoporosis. San Diego, Calif: Academic Press; 1996.
145. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 1987 Dec;2(6):595-610.
146. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus MJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
147. American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. J Bone Miner Res. 2000 Dec;15(12):2293-2296.
148. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al., Amgen EST Program. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89:159–161.
149. Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 1997;234:137–142.
150. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Apr 1;22(4):549-553.
151. Von Recklinghausen FD. Die Fibrose oder deformierende Ostitis, die Osteomalazie und die osteoplastische Carzinose in ihren gegenseitigen Beziehungen. [Osteitis fibrosa or deformans, osteomalacia and osteoplastic carcinosis in their relationships.] Berlin: George Reimer; 1891:1.

152. Gorres G, Kaim A, Otte A, Gotze M, Muller-Brand J. Bone mineral density in patients receiving suppressive doses of thyroxine for differentiated thyroid carcinoma. Eur J Nucl Med. 1996;23:690-2.
153. Schneider DL, Barrett-Connor EL, Morton DJ. Thyroid hormone use and bone mineral density in elderly men. Arch Intern Med 1995;155:2005-7.
154. Toh SH, Brown PH. Bone mineral content in hypothyroid male patients with hormone replacement: a 3-year study. J Bone Miner Res 1990;5:463-7.
155. Nguyen TT, Heath H 3d, Bryant SC, O'Fallon WM, Melton L J 3d. Fractures after thyroidectomy in men: a population-based cohort study. J Bone Miner Res 1997;12:1092-9.
156. Marcocci C, Golia F, Vignali E, Pinchera A. Skeletal integrity in men chronically treated with suppressive doses of L-thyroxine. J Bone Miner Res 1997;12:72-7.
157. Poor G, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton L J 3d. Predictors of hip fractures in elderly men. J Bone Miner Res. 1995;10:1900-7.
158. Sato K. Graves' disease and bone metabolism. Nippon Rinsho 2006 Dec;64(12):2317-2322.
159. Campos-Pastor MM, Minoz-Torres M, Escobar-Jimenez F, Ruiz de Almodovar M, Jodar Gimendo E. Bone mass in females with different thyroid disorders: influence of menopausal status. Bone Miner 1993 Apr;21(1):1-8.
160. Arata N, Momotani N, Maruyama H, Saruta T, Tsukatani K, Kubo A, Ikemoto K, Ito K. Bone mineral density after surgical treatment for Graves' disease. Thyroid 1997 Aug;7(4):547-554.
161. Langdahl BL, Loft AGR, Eriksen EF, Mosekilde L, Charles P. Bone mass, bone turnover, calcium homeostasis, and body composition in former hyperthyroid patients treated by combined therapy. Thyroid 1996;6:161-168.
162. Serraclara A, Jodar E, Sarabia F, Hawkins F. Bone mass after long-term euthyroidism in former hyperthyroid women treated with (131)I influence of menopausal status. J Clin Densitom 2001;4(3):249-255.
163. Foldes J, Tarjan G, Szathmari M, Varga F, Krasznai I, Horvath C. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? Clin Endocrinol (Oxf) 1993 Nov;39(5):521.527.
164. Ugur-Altum B, Altin A, Arikan E, Guldiken S, Tugrul A. Relationship existing between the serum cytokine levels and bone mineral density in women in the premenopausal

period affected by Graves' disease with subclinical hyperthyroidism. Endocr Res 2003 Nov;29(4):389-398.

165. Tauchmanova L, Nuzzo V, Del Puente A et al. Reduced bone mass detected by bone quantitative ultrasonometry and DEXA in pre- and postmenopausal women with endogenous subclinical hyperthyroidism. Maturitas 2004 Jul;15(3):299-306.
166. Langdahl BL, Loft AG, Moller N et al. Skeletal responsiveness to thyroid hormone is not altered at menopause. Bone 1996 Nov;19(5)557-564.
167. Campos-Pastor MM, Munoz-Torres M, Escobar-Jimenez F, Ruiz de Almodovar M, Jodar Gimeno E. Bone mass in females with different thyroid disorders: influence of menopausal status. Bone Miner. 1993 Apr;21(1):1-8.
168. Bauer DC, Ettinger B, Nevitt CN, Katie LS. Risk for fracture in women with low serum levels of Thyroid-stimulating hormone. Ann Intern Med 2001;134:561-568.
169. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. N Engl J Med. 1995;332:767-73.
170. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. Biochem Biophys Res Commun 2002 Mar 8;291(4):987-994
171. Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL-RANK interaction. J Cell Physiol. 2004 Oct;201(1):17-25.
172. Bassett JH, O'Shea PJ, Sriskantharajah S, Rabier B, Boyde A, Howell PG, et al Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. Mol Endocrinol 2007 May;21(5):1095-1107.
173. van der Deure WM, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Pols HA, Peeters RP, Visser TJ. Effects of serum TSH and FT4 levels and the TSHR-Asp727Glu polymorphism on bone: the Rotterdam Study. Clin Endocrinol (Oxf). 2007 Sep 4.
174. Abe E, Marians RC, Yu W. et al. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. Cell 2003 Oct 17;117:151-162.
175. Hase H, Ando T, Eldeiry L, Brebene A, Peng Y, Liu L, Amano H, Davies TF, Sun L, Zaidi M, Abe E. TNFalpha mediates the skeletal effects of thyroid-stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Aug 22;103(34):12849-54.

176. Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, Schiavi SC, McPherson JM, Vukicevic S. Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. J Bone Miner Res 2007 Jun;22(6):849-859.
177. Papadimitriou A, Papadimitriou DT, Papadopoulou A, Nicolaidou P, Fretzayas A. Low TSH levels are not associated with osteoporosis in childhood. Eur J Endocrinol. 2007 Aug;157(2):221-223.
178. Tsai JA, Janson A, Bucht E, Kindmark H, Marcus C, Stark A, Zemack HR, Torring O. Weak evidence of thyrotropin receptors in primary cultures of human osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int 2004;74:486–491.
179. Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Cioffi M, Pilla P, Biondi B,Recombinant human TSH modulates in vivo C-telopeptides of type-1 collagen and bone alkaline phosphatase, but not osteoprotegerin production in postmenopausal women monitored for differentiated thyroid carcinoma. J Bone Miner Res. 2005 Mar;20(3):480-6.
180. Giusti M, Cecoli F, Ghiara C, Rubinacci A, Villa I, Cavallero D, Mazzuoli L. Recombinant human thyroid stimulating hormone does not acutely change serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaBeta ligand in patients under evaluation for differentiated thyroid carcinoma*.Hormones (Athens). 2007 Oct-Dec;6(4):304-13.
181. Thompson PD, Hsieh JC, Whitfield GK et al. Vitamin D receptor displays DNA binding and transactivation as a heterodimer with the retinoid X receptor, but not with the thyroid hormone receptor. J Cell Biochem. 1999 Dec 1;75(3):462-80.
182. Raval-Pandia M, Freedman LP, Li H, Christakos S. Thyroid hormone receptor does not heterodimerize with the vitamin D receptor but represses vitamin D receptor-mediated transactivation. Mol Endocrinol 1998;12(9):1367-1379.
183. Yen PM, Liu Y, Sugawara A, Chin WW. Vitamin D receptors repress basal transcription and exert dominant negative activity on triiodothyronine-mediated transcriptional activity. The Journal of Biological Chemistry 1996;10910-10916.
184. Krakauer JC, Kleerekoper M. Borderline-low serum thyrotropin level is correlated with increased fasting urinary hydroxyproline excretion. Arch Intern Med. 1992;152:360-4.
185. Harvey RD, McHardy KC, Reid IW, Paterson F, Bewsher PD, Duncan A, et al. Measurement of bone collagen degradation in hyperthyroidism and during thyroxine

replacement therapy using pyridinium cross-links as specific urinary markers. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:1189-94.

186. Solomon B Wartofsky L Burman KD. Prevalence of fractures in postmenopausal women with thyroid disease. Thyroid 1993 Spring;3(1):17-23.
187. Karga H, Papapetrou PD, Korakovouni A, Papandroulaki F, Polymeris A, Pampouras G. Bone mineral density in hyperthyroidism. Clin Endocrinol (Oxf). 2004 Oct;61(4):466-472.
188. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. Endocr Rev. 1986;7:379-408.
189. Ross DS. Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone. Thyroid 1994;4:319-326.
190. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormone on bone and mineral metabolism. Endocrinol Metab Clin North Am. 1990;19:35-63.
191. Greenspan SL and Greenspan FS. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. Ann Intern Med 1999;130:750-758.
192. Mosekilde l, Melsen F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. Acta Pathol Microbiol Scand [A]. 1978 Jan;86(1):56-62.
193. Lucidarme N, Ruiz JC, Czernichow P, Léger J. Reduced bone mineral density at diagnosis and bone mineral recovery during treatment in children with Graves' disease. J Pediatr 2000 Jul;137(1):56-62.
194. Vestergaard P, Mosekilde L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. Thyroid. 2002 May;12(5):411-419.
195. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Influence of hyper- and hypothyroidism, and the effects of treatment with antithyroid drugs and levothyroxine on fracture risk. Calcif Tissue Int. 2005 Sep;77(3):139-144.
196. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. Endocr Rev. 1986 Nov;7(4):379-408.
197. Jelčić J, Kifer T, Kušec V, Koršić. Thyroid disfunction and bone mass. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2000. Vienna, 2000. Nov 30-Dec 2.

198. Vestergaard P, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Rejnmark L, et al. Fractures in patients with primary idiopathic hypothyroidism. Thyroid. 2000 Apr;10(4):335-340.
199. Wu S, Lei SF, Chen XD, Tan LJ, et al. The contributions of lean tissue mass and fat mass to bone geometric adaptation at the femoral neck in Chinese overweight adults. Ann Hum Biol. 2007 May-Jun;34(3):344-353.
200. Pesonen J, Sirola J, Tuppurainen M, Jurvelin J, Alhava E, Honkanen R, Kröger H. High bone mineral density among perimenopausal women. Osteoporos Int. 2005 Dec;16(12):1899-1906.
201. Duncan WE, Chang A, Solomon B, Wartofsky L. Influence of clinical characteristics and parameters associated with thyroid hormone therapy on the bone mineral density of women treated with thyroid hormone. Thyroid. 1994 Summer;4(2):183-190.
202. Chen CH, Chen JF, Yang BY, Liu RT, Tung SC, Chien WY et al. Bone mineral density in women receiving thyroxine suppressive therapy for differentiated thyroid carcinoma. J Formos Med Assoc. 2004 Jun;103(6):442-447.
203. Nuzzo V, Lupoli G, Esposito Del Puente A, Rampone E, Carpinelli A, Del Puente AE, Oriente P. Bone mineral density in premenopausal women receiving levothyroxine suppressive therapy. Gynecol Endocrinol. 1998 Oct;12(5):333-337.
204. Mazokopakis EE, Starakis IK, Papadomanolaki MG, Batistakis AG, Papadakis JA et al. Changes of bone mineral density in pre-menopausal women with differentiated thyroid cancer receiving L-thyroxine suppressive therapy. Curr Med Res Opin. 2006 Jul;22(7):1369-1373.
205. Hanna FW, Pettit RJ, Ammari F, Evans WD, Sandeman D, Lazarus JH. Effect of replacement doses of thyroxine on bone mineral density. Clin Endocrinol (Oxf). 1998 Feb;48(2):229-234.
206. Young D, Hopper JL, Macinnis RJ, Nowson CA, Hoang NH, Wark JD. Changes in body composition as determinants of longitudinal changes in bone mineral measures in 8 to 26-year-old female twins. Osteoporos Int. 2001;12(6):506-515.
207. Gnudi S, Sitta E, Fiumi N.Relationship between body composition and bone mineral density in women with and without osteoporosis: relative contribution of lean and fat mass. J Bone Miner Metab. 2007;25(5):326-332.

208. Wang MC, Bachrach LK, Van Loan M, Hudes M, Flegal KM, Crawford PB.The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. Bone. 2005 Oct;37(4):474-481.
209. Matsuo T, Douchi T, Nakae M, Uto H, Oki T, Nagata Y. Relationship of upper body fat distribution to higher regional lean mass and bone mineral density. J Bone Miner Metab. 2003;21(3):179-183.
210. Sööt T, Jürimäe T, Jürimäe J, Gapeyeva H, Pääsuke M.Relationship between leg bone mineral values and muscle strength in women with different physical activity. J Bone Miner Metab. 2005;23(5):401-406.
211. Reid IR.Relationships among body mass, its components, and bone. Bone. 2002 Nov;31(5):547-555.
212. Woo J, Ho SC, Sham A.Longitudinal changes in body mass index and body composition over 3 years and relationship to health outcomes in Hong Kong Chinese age 70 and older. J Am Geriatr Soc. 2001 Jun;49(6):737-746.
213. Visser M, Pahor M, Tylavsky F, Kritchevsky SB, Cauley JA, Newman AB, Blunt BA, Harris TB. One- and two-year change in body composition as measured by DXA in a population-based cohort of older men and women. J Appl Physiol. 2003 Jun;94(6):2368-2374.
214. Galvard H, Elmståhl S, Elmståhl B, Samuelsson SM, Robertsson E. Differences in body composition between female geriatric hip fracture patients and healthy controls: body fat is more important as explanatory factor for the fracture than body weight and lean body mass. Aging (Milano). 1996 Aug;8(4):282-286.
215. Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, Mautino F, Cavanna A.Body composition and hip fracture type in elderly women. Clin Rheumatol. 2004 Feb;23(1):6-10.
216. Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, Tappero R, Cavanna A. Skeletal muscle mass, fat mass, and hip bone mineral density in elderly women with hip fracture. J Bone Miner Metab. 2007;25(4):237-242.
217. Barbeau P, Johnson MH, Howe CA, Allison J, Davis CL, Gutin B, Lemmon CR. Ten months of exercise improves general and visceral adiposity, bone, and fitness in black girls. Obesity (Silver Spring). 2007 Aug;15(8):2077-2085.
218. Taguchi A, Tsuda M, Ohtsuka M, Nakamoto T, Inagaki K, Noguchi T, Interaction of obesity and skeletal bone mineral density in tooth retention in Japanese postmenopausal women. Menopause. 2007 May-Jun;14(3 Pt 1):500-504.

219. Kaji H, Tobimatsu T, Naito J, Iu MF, Yamauchi M, Sugimoto T, Chihara K. Body composition and vertebral fracture risk in female patients treated with glucocorticoid. Osteoporos Int. 2006;17(4):627-633.
220. Goulding A, Grant AM, Williams SM. Bone and body composition of children and adolescents with repeated forearm fractures. J Bone Miner Res. 2005 Dec;20(12):2090-2096.
221. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, Manning PJ, Williams SM. More broken bones: a 4-year double cohort study of young girls with and without distal forearm fractures. J Bone Miner Res. 2000 Oct;15(10):2011-2018.
222. Jones IE, Williams SM, Goulding A. Associations of birth weight and length, childhood size, and smoking with bone fractures during growth: evidence from a birth cohort study. Am J Epidemiol. 2004 Feb 15;159(4):343-350.
223. Goulding A, Cannan R, Williams SM, Gold EJ, Taylor RW, Lewis-Barned NJ. Bone mineral density in girls with forearm fractures. J Bone Miner Res. 1998 Jan;13(1):143-148.
224. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, Williams SM, Manning PJ. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: a dual-energy x-ray absorptiometry study. J Pediatr. 2001 Oct;139(4):509-515.
225. Ischander M, Zaldivar F Jr, Eliakim A, Nussbaum E, Dunton G, Leu SY, et al. Physical activity, growth, and inflammatory mediators in BMI-matched female adolescents. Med Sci Sports Exerc. 2007 Jul;39(7):1131-1138.
226. Tang ZH, Xiao P, Lei SF, Deng FY, Zhao LJ, Deng HY, Tan LJ, Shen H, Xiong DH, Recker RR, Deng HWA bivariate whole-genome linkage scan suggests several shared genomic regions for obesity and osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jul;92(7):2751-2757.
227. Bustamante M, Nogués X, Mellibovsky L, Agueda L, Jurado S, Cáceres EPolymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with bone mineral density and body mass index in Spanish postmenopausal women. Eur J Endocrinol. 2007 Nov;157(5):677-684.
228. Huang QY, Shen H, Deng HY, Conway T, Davies KM, Li JL, Recker RR, Deng HW. Linkage and association of the CA repeat polymorphism of the IL6 gene, obesity-related phenotypes, and bone mineral density (BMD) in two independent Caucasian populations. J Hum Genet. 2003;48(8):430-437.

229. Pistilli EE, Gordish-Dressman H, Seip RL, Devaney JM, Thompson PD, Price TB, et al. Resistin polymorphisms are associated with muscle, bone, and fat phenotypes in white men and women. Obesity (Silver Spring). 2007 Feb;15(2):392-402.
230. Zhao LJ, Guo YF, Xiong DH, Xiao P, Recker RR, Deng HW. 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 Nov;120(4):561-570.
231. Guérardel A, Tankó LB, Boutin P, Christiansen C, Froguel P. Obesity susceptibility CART gene polymorphism contributes to bone remodeling in postmenopausal women. Osteoporos Int. 2006 Jan;17(1):156-157.
232. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. Recent Prog Horm Res. 2004;59:333-537.
233. Sun X, Lei SF, Deng FY, Wu S, Papacian C, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Genetic and environmental correlations between bone geometric parameters and body compositions. Calcif Tissue Int. 2006 Jul;79(1):43-49.
234. Xiong DH, Shen H, Xiao P, Guo YF, Long JR, Zhao LJ, Liu YZ, Deng HY, Li JL, Recker RR, Deng HW.Genome-wide scan identified QTLs underlying femoral neck cross-sectional geometry that are novel studied risk factors of osteoporosis. J Bone Miner Res. 2006 Mar;21(3):424-437.
235. Kitamura I, Ando F, Koda M, Okura T, Shimokata H. Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor alpha gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. Bone. 2007 Jun;40(6):1623-1629.
236. Lorentzon M, Eriksson AL, Nilsson S, Mellström D, Ohlsson C. Association between physical activity and BMD in young men is modulated by catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype: the GOOD study. J Bone Miner Res. 2007 Aug;22(8):1165-1172.
237. Lorentzon M, Mellström D, Ohlsson C. Association of amount of physical activity with cortical bone size and trabecular volumetric BMD in young adult men: the GOOD study. J Bone Miner Res. 2005 Nov;20(11):1936-1943.
238. Pocock N, Eisman J, Gwinn T, Sambrook P, Kelly P, Freund J, Yeates M. Muscle strength, physical fitness, and weight but not age predict femoral neck bone mass.J Bone Miner Res. 1989 Jun;4(3):441-448.

239. Liu JM, Zhao HY, Ning G, et al. Relationship between body composition and bone mineral density in healthy young and premenopausal Chinese women. Osteoporos Int. 2004 Mar;15(3):238-242.
240. Hill DD, Cauley JA, Sheu Y, Bunker CH, Patrick AL, Baker CE, Beckles GL, Wheeler VW, Zmuda JM. Correlates of bone mineral density in men of African ancestry: The Tobago Bone Health Study. Osteoporos Int. 2007 Sep 14;
241. Janicka A, Wren TA, Sanchez MM, Dorey F, Kim PS, Mittelman SD, Gilsanz V. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. J Clin Endocrinol Metab 2007 Jan;92(1):143-147.
242. Horber FF, Thomi F, Casez JP, Fonteille J, Jaeger P. Impact of hydration status on body composition as measured by dual energy X-ray absorptiometry in normal volunteers and patients on haemodialysis. Br J Radiol 1992 Oct;65(778):895-900.
243. Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. Am J Clin Nutr. 2006 Jan;83(1):146-154.
244. Rauch F, Blum WF, Klein K, Allolio B, Schonau E. Does leptin have an effect on bone in adult women? Calcif Tissue Int 1998;63:453–455.
245. Odabasi E, Ozata M, Turan M, Bingol N, Yonem A, Cakir B, Kutlu M, Ozdemir IC. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. Eur J Endocrinol 2000;142:170–173.
246. Martini G, Valenti R, Giovani S, Franci B, Campagna S, Nuti R. Influence of insulin-like growth factor-1 and leptin on bone mass in healthy postmenopausal women. Bone 2001;28:113–117.
247. Ruhl CE, Everhart JE. Relationship of serum leptin concentration with bone mineral density in the United States population. J Bone Miner Res 2002;17:1896–1903.
248. Yilmazi M, Keleş I, Aydin G, Orkun S, Bayram M, Sevinc FC, Kisa U, Yetkin I. Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. Endocr Res. 2005;31(2):133-138.
249. Sahin G, Polat G, Baethiş S, Milcan A, Baethdatoethlu O, Erdoethan C, Camdeviren H. Body composition, bone mineral density, and circulating leptin levels in postmenopausal Turkish women. Rheumatol Int. 2003 Mar;23(2):87-91.

250. Zhong N, Wu XP, Xu ZR,.et al. Relationship of serum leptin with age, body weight, body mass index, and bone mineral density in healthy mainland Chinese women. Clin Chim Acta. 2005 Jan;351(1-2):161-168.
251. Goulding A, Taylor RW. Plasma leptin values in relation to bone mass and density and to dynamic biochemical markers of bone resorption and formation in postmenopausal women. Calcif Tissue Int 1998;63:456–458.
252. Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, Nakaoka D, Kanzawa M, Yano S, Ozuru R, Sugishita T, Chihara K. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. Clin Endocrinol (Oxf) 2001;55:341–347.
253. Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, Collier GR, Ball MJ, Ugoni AM, Nicholson GC. Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:1884–1887.
254. Thomas T, Burguera B, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. Bone 2001;29:114–120.
255. Blum M, Harris SS, Must A, Naumova EN, Phillips SM, Rand WM, Dawson-Hughes B. Leptin, body composition and bone mineral density in premenopausal women. Calcif Tissue Int 2003;73: 27–32.
256. Westvik J. Radiological features in generalised lipodystrophy. Acta Paediatr 1996;413(Suppl):44–51.
257. Sato M, Takeda N, Sarui H, Takami R, Takami K, Hayashi M, Sasaki A, Kawachi S, Yoshino K, Yasuda K. Association between serum leptin concentrations and bone mineral density, and biochemical markers of bone turnover in adult men. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5273–5276.
258. Ormarsdottir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olofsson H, Blum WF, Loof L. Inverse relationship between circulating levels of leptin and bone mineral density in chronic liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:1409–1414.
259. Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, Durant R, Hanesse B, de Talance N, Doucet B, Jeandel C. Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1030–1035.

260. Chanprasertyothin S, Piaseu N, Chailurkit L, Rajatanavin R, Ongphiphadhanakul B. Association of circulating leptin with bone mineral density in males and females. J Med Assoc Thai. 2005 May;88(5):655-9.
261. Kontogianni MD, Dafni UG, Routsias JG, Skopouli FN. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. J Bone Miner Res. 2004 Apr;19(4):546-551.
262. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. Endocrinology 1999;140:1630–1638.
263. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. J Bone Miner Res 2001;16:1426–143.
264. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. Endocrinology 2001;142:3546–3553.
265. Holloway WR, Collier FM, Aitken CG, Malakellis M, Gough TJ, Myers DE, Collier GR, Nicholson GC. Leptin inhibits osteoclast generation. J Bone Miner Res 2000;15:S1;S174.
266. Gregoire Nyomba BL, Johnson M, Berard L, Murphy LJ. Relationship between serum leptin and the insulin-like growth factor-I system in humans. Metabolism 1999;48:840–844.
267. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. Cell 2000;100:197–207.
268. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. Cell Metab. 2006 Nov;4(5):341-8.
269. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Cell 2002 111:305–317.
270. Richards JB, Valdes AM, Burling K, Perks UC, Spector TD. Serum adiponectin and bone mineral density in women. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Apr;92(4):1517-1523.
271. Jürimäe J, Rembel K, Jürimäe T, Rehand M. Adiponectin is associated with bone mineral density in perimenopausal women. Horm Metab Res. 2005 May;37(5):297-302.

272. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. J Bone Miner Res 2006 Oct;21(10):1648-1656.

273. Oh KW, Lee WY, Rhee EJ. et. al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Aug;63(2):131-138.

274. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell. 2001 Nov 16;107(4):513-523.

275. Ford EB. Polymorphism and taxonomy, in Huxley J, ed.: The New Systematics, Oxford: Clarendon Press 1940;493-513.

276. Wyandt HE, Tonk VS. Atlas of Human Chromosome Heteromorphisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 2004.

277. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC et al.; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001 Feb 15;409(6822):928-33.

278. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alelles. Nature. 1994;367:284-287. Erratum in: Nature 1997 May 1;387(6628):106.

279. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor locus. J Clin Invest 1994 Nov;94 (5):2130-2134.

280. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, Orimo H. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. Biochem Biophys Res Commun 1995 Dec 5;217(1):378-383.

281. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha gene. Nat Genet 1996 Oct;14(2):203-205.

282. Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. Lancet. 2003 Feb 15;361(9357):567-571.

283. Shapiro S. Meta-analysis/shmeta-analysis. Am J Epidemiol 1994;140:771–8.

284. MacArthur C, Foran PJ, Bailar JC 3rd. Qualitative assessment of studies included in a meta-analysis: DES and the risk of pregnancy loss. J Clin Epidemiol 1995;48:739–47.
285. Blettner M, Sauerbrei W, Schlehofer B, et al. Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology. Int J Epidemiol 1999;28:1–9.
286. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. Systematic reviews of trials and other studies. 3Health Technology Assessment 1998; Vol. 2: No. 19.
287. Easterbrook PJ, Berlin J, Gopalan R, Matthews DR. Publication bias in clinical research. Lancet 1991;337:867–72.
288. Dickersin K, Min YL, Meinert CL. Factors influencing publication of research results. Follow-up of applications submitted to two institutional review boards. JAMA 1992;267:374–8.
289. Stern JM, Simes RJ. Publication bias: evidence of delayed publication in a cohort study of clinical research projects. Br Med J 1997; 315:640–5.
290. Sterne JA, Gavaghan D, Egger M. Publication and related bias in meta-analysis: power of statistical tests and prevalence in the literature. J Clin Epidemiol 2000 Nov;53(11):1119-29.
291. Easterbrook PJ, Berlin JA, Gopalan R, Matthews DR. Publication bias in clinical research. Lancet. 1991 Apr 13;337(8746):867-872.
292. Gregoire G, Derderian F, Lelorier J, Le Lorier J. Selecting the language of the publications included in a meta-analysis – is there a Tower-of-Babel bias? J Clin Epidemiol 1995;48:159-163.
293. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. JAMA 2000;283:2008–12.
294. Reid DM, Mackay I, Wilkinson S, et al. Cross-calibration of dual-energy X-ray densitometers for a large, multi-center genetic study of osteoporosis. Osteoporos Int. 2006 Jan;17(1):125-132.
295. 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 1992;89:6665-6669.
296. Ioannidis JPA, O'Brien TR, Rosenberg PS, et al. Genetic effects on HIV disease progression. (Letter). Nat Med 1998;4:536.

297. Ioannidis JPA, Rosenberg PhS, Goedert JJ, O'Brien RO fpr the International Meta-analysis of HIV Host Genetics. Commentary: Meta-analysis of Individual Participant's Data in Genetic Epidemiology. Am J Epidemiol 2002; 156(3):204-210.
298. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. J Bone Miner Res 1996 Dec;11(12):1841-1849.
299. Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, Recker RR. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. Osteoporos Int 1999;9(1):55-64.
300. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. J Bone Miner Res 2004 Mar;19(3):419-428.
301. Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. Osteoporos Int 2004 Sep;15(9):729-734.
302. Fang Y, Rivadeneira F, van Meurs JB, Pols HA, Ioannidis JP, Uitterlinden AG. Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. Bone 2006 Oct;39(4):938-945.
303. Zintzaras E, Rodopoulou P, Koukoulis GN. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: a meta-analysis. Dis Markers 2006;22(5-6):317-326.
304. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: The Rotterdam study. Am J Hum Genet. 2005 Nov;77(5):807-823.
305. Efstathiadou Z , Tsatsoulis A i Ioannidis JP. Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis. J Bone Miner Res. 2001 Sep;16(9):1586-92.
306. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. Bone. 2003 Jun;32(6):711-717.
307. Stewart TL, Roschger P, Misof BM, Mann V, Fratzl P, Klaushofer K, Aspden R, Ralston SH. Association of COLIA1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization in vivo. Calcif Tissue Int 2005 Aug;77(2):113-8. Epub 2005 May 19.

308. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. J Clin Invest. 2001 Apr;107(7):899-907.

309. Ioannidis JP, Stavrou I, Trikalinos TA, et al. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. J Bone Miner Res 2002 Nov;17(11):2048-2060.

310. Li Y, Sun CH, Yin H, Chen YF. Association of polymorphism of low density lipoprotein receptor-related protein 5 Q89R, A1330V with bone mineral density in premenopausal northern Chinese women. Wei Sheng Yan Jiu 2006 Sep;35(5):576-579.

311. Greendale GA, Chu J, Ferrell R, Randolph JF Jr, Johnston JM, Sowers MR. The association of bone mineral density with estrogen receptor gene polymorphisms. Am J Med. 2006 Sep;119(9 Suppl 1):S79-86.

312. Laflamme N, Giroux S, Loredo-Osti JC, et al. A frequent regulatory variant of the estrogen-related receptor alpha gene associated with BMD in French-Canadian premenopausal women. J Bone Miner Res 2005 Jun;20(6):938-944.

313. Jiang DK, Shen H, Li MX, et al. No major effect of the insulin-like growth factor I gene on bone mineral density in premenopausal Chinese women. Bone. 2005 Apr;36(4):694-499.

314. Qin YJ, Zhang ZL, Huang QR et al. Association of vitamin D receptor and estrogen receptor-alpha gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. Acta Pharmacol Sin. 2004 Apr;25(4):462-468.

315. Grundberg E, Brandstrom H, Ribom EL, Ljunggren O, Kindmark A, Mallmin H.A poly adenosine repeat in the human vitamin D receptor gene is associated with bone mineral density in young Swedish women. Calcif Tissue Int 2003 Nov;73(5):455-462.

316. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. J Hum Genet. 2003;48(5):243-248.

317. Willing M, Sowers M, Aron D, Clark MK, et. al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. J Bone Miner Res. 1998 Apr;13(4):695-705.

318. Lazaretti-Castro M, Duarte-de-Oliveira MA, Russo EM, Vieira JG..Vitamin D receptor alleles and bone mineral density in a normal premenopausal Brazilian female population. Braz J Med Biol Res. 1997 Aug;30(8):929-932.

319. Salamone LM, Ferrell R, Black DM, et. al. The association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density at the spine, hip and whole-body in premenopausal women. Osteoporos Int. 1996;6(1):63-8. Erratum in: Osteoporos Int 1996;6(3):187-188.
320. Fleet JC, Harris SS, Wood RJ, Dawson-Hughes B. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. J Bone Miner Res 1995 Jun;10(6):985-990.
321. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. J Bone Miner Res 1996 Jul;11(7):1003-1009.
322. Keen RW, Snieder H, Molloy H, et al. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins. Rheumatology (Oxford). 2001 Jan;40(1):48-54. Erratum in: Rheumatology (Oxford) 2001 Sep;40(9):1078.
323. Mo XY, Zhang YY, Lei SF, Deng HW. [A986S polymorphism of calcium-sensing receptor gene is not related to bone mineral density or bone size in premenopausal Chinese women]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2004 Oct;24(10):1097-101, 1122.
324. Cheng WC, Tsai KS.The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok1) and bone mineral density in premenopausal women in Taiwan. Osteoporos Int. 1999;9(6):545-549.
325. Hansen TS, Abrahamsen B, Henriksen FL,Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish perimenopausal women. Bone 1998 May;22(5):571-575.
326. Eccleshall TR, Garnero P, Gross C, Delmas PD, Feldman D. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. J Bone Miner Res. 1998 Jan;13(1):31-35.
327. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. J Bone Miner Res. 1995 Sep;10(9):1283-1288.
328. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. Int J Mol Med 2007 May;19(5):791-801.

329. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of polymorphisms in forkhead box C2 and perilipin genes with bone mineral density in community-dwelling Japanese individuals. Int J Mol Med 2006 Jul;18(1):119-127.
330. Eckstein M, Vered I, Ish-Shalom S, et al. Vitamin D and calcium-sensing receptor genotypes in men and premenopausal women with low bone mineral density. Isr Med Assoc J. 2002 May;4(5):340-344.
331. Long JR, Liu PY, Liu YJ, et al. APOE haplotypes influence bone mineral density in Caucasian males but not females. Calcif Tissue Int 2004 Oct;75(4):299-304.
332. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. Mol Genet Metab 2003 Nov;80(3):344-349.
333. Lau HH, Ho AY, Luk KD, Kung AW. Estrogen receptor beta gene polymorphisms are associated with higher bone mineral density in premenopausal, but not postmenopausal southern Chinese women. Bone 2002 Aug;31(2):276-281.
334. Sobacchi C, Vezzoni P, Reid DM et al. Association between a polymorphism affecting an AP1 binding site in the promoter of the TCIRG1 gene and bone mass in women. Calcif Tissue Int. 2004 Jan;74(1):35-41.
335. Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, et al. Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in premenopausal women but not in postmenopausal women. J Endocrinol Invest 1998 Sep;21(8):487-493
336. Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. Bone. 1997 Nov;21(5):379-383.
337. Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. Association of calcitonin receptor gene polymorphism with bone mineral density in Shanghai women. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2003 Jun;25(3):258-261.
338. Zhang YY, Long JR, Liu PY, Liu YJ, Shen H, Zhao LJ, Deng HW. Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: association study of healthy pre- and postmenopausal Chinese women. Biochem Biophys Res Commun 2003 Sep 5;308(4):777-783.
339. Ho AY, Yeung SS, Kung AW. PvuII polymorphisms of the estrogen receptor alpha and bone mineral density in healthy southern Chinese women. Calcif Tissue Int 2000 Jun;66(6):405-408.

340. Ongphiphadhanakul B, Chanprasertyothin S, Saetung S, Rajatanavin R.A specific haplotype in the 3' end of estrogen-receptor alpha gene is associated with low bone mineral density in premenopausal women and increased risk of postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int 2005 Oct;16(10):1233-1238.
341. Laaksonen M, Karkkainen M, Outila T, Vanninen T, Ray C, Lamberg-Allardt C.Vitamin D receptor gene BsmI-polymorphism in Finnish premenopausal and postmenopausal women: its association with bone mineral density, markers of bone turnover, and intestinal calcium absorption, with adjustment for lifestyle factors. J Bone Miner Metab. 2002;20(6):383-390.
342. Braga V, Mottes M, Mirandola S, et al. Association of CTR and COLIA1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women. Calcif Tissue Int. 2000 Nov;67(5):361-366.
343. Murray RE, McGuigan F, Grant SF, Reid DM, Ralston SH. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. Bone 1997 Jul;21(1):89-92.
344. Kurabayashi T, Matsushita H, Kato N, et. al. Effect of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphism on the relationship between dietary calcium and bone mineral density in Japanese women. J Bone Miner Metab. 2004;22(2):139-147.
345. Morita A, Iki M, Dohi Y, et al., JPOS Study Group. 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 Oct;33(5):979-988.
346. Mo XY, Cao CK, Xu FH, et al. Lack of association between the HindIII RFLP of the osteocalcin (BGP) gene and bone mineral density (BMD) in healthy pre- and postmenopausal Chinese women.J Bone Miner Metab 2004;22(3):264-269.
347. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. Calcif Tissue Int 2002 Jul;71(1):26-35.
348. Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, Uitterlinden AG, Smit JH., et al. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. Ann Rheum Dis 2004;63: 71–77.

349. Alvarez-Hernandez D, Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Santamaria I, Cannata-Andia JB. Influence of polymorphisms in VDR and COLIA1 genes on the risk of osteoporotic fractures in aged men. Kidney Int Suppl. 2003 Jun;(85):S14-8.
350. Horst-Sikorska W, Wawrzyniak A, Celczynska-Bajew L, Marcinkowska M, Dabrowski S, Kalak R, Slomski R. Polymorphism of VDR gene-the most effective molecular marker of osteoporotic bone fractures risk within postmenopausal women from Wielkopolska region of Poland. Endokrynol Pol. 2005 May-Jun;56(3):233-239.
351. Gennari L, Masi L, Merlotti D, Picariello L, Falchetti et al. A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. J Clin Endocrinol Metab 2004 Jun;89(6):2803-2810.
352. Braga V, Sangalli A, Malerba G, et al. Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men. Calcif Tissue Int 2002 Jun;70(6):457-462.
353. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. Eur J Clin Invest 2000 Jul;30(7):608-617.
354. Braga V, Sangalli A, Malerba G, et al. Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men. Calcif Tissue Int 2002 Jun;70(6):457-462.
355. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SF, Eriksen EF. An Sp1 binding site polymorphism in the COLIA1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. J Bone Miner Res. 1998 Sep;13(9):1384-1389.
356. Long JR, Liu PY, Liu YJ, Lu Y, Shen H, Zhao LJ, Xiong DH, Deng HW.APOE haplotypes influence bone mineral density in Caucasian males but not females. Calcif Tissue Int. 2004 Oct;75(4):299-304.
357. Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C, et al. LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. Bone 2005 Dec;37(6):770-775.
358. Papiha SS, Allcroft LC, Kanan RM, Francis RM, Datta HK. Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA)(n)-Alu polymorphism in DBP. Calcif Tissue Int 1999 Oct;65(4):262-266.
359. Huang QR, Zhang ZL, Qin YJ, et al. Association of Apa I polymorphism of vitamin D receptor gene with bone mass in men. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2003 Jun;25(3):254-257.

360. Remes T, Vaisanen SB, Mahonen A, Huuskonen J, Kroger H, Jurvelin JS, Rauramaa R. Bone mineral density, body height, and vitamin D receptor gene polymorphism in middle-aged men. Ann Med 2005;37(5):383-92.
361. Bell NH, Morrison NA, Nguyen TV, Eisman J, Hollis BW. ApaI polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. J Lab Clin Med 2001 Feb;137(2):133-40.
362. Lorentzon M, Swanson C, Eriksson AL, Mellstrom D, Ohlsson C. Polymorphisms in the aromatase gene predict areal BMD as a result of affected cortical bone size: the GOOD study. J Bone Miner Res 2006 Feb;21(2):332-9.
363. Saarinen A, Valimaki VV, Valimaki MJ, et al. The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men. Bone 2007 Apr;40(4):1006-12.
364. Wang CY, Nguyen ND, Morrison NA, Eisman JA, Center JR, Nguyen TV. Beta3-adrenergic receptor gene, body mass index, bone mineral density and fracture risk in elderly men and women: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study (DOES). BMC Med Genet 2006 Jul 5;7:57.
365. Medici M, van Meurs JB, Rivadeneira F, Zhao H, Arp PP, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG. BMP-2 gene polymorphisms and osteoporosis: the Rotterdam Study. J Bone Miner Res. 2006 Jun;21(6):845-54.
366. Ichikawa S, Koller DL, Johnson ML, et al. Human ALOX12, but not ALOX15, is associated with BMD in white men and women. J Bone Miner Res 2006 Apr;21(4):556-564.
367. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. J Bone Miner Res 2006 Jan;21(1):141-150.
368. Crabbe P, Balemans W, Willaert A, et al. Missense mutations in LRP5 are not a common cause of idiopathic osteoporosis in adult men. J Bone Miner Res 2005 Nov;20(11):1951-1959.
369. Lei SF, Zhang YY, Deng FY, Liu MY, Liu XH, Zhou XG, Deng HW. Bone mineral density and five prominent candidate genes in Chinese men: associations, interaction effects and their implications. Maturitas 2005 Jun 16;51(2):199-206.

370. Lorentzon M, Eriksson AL, Mellstrom D, Ohlsson C. The COMT val158met polymorphism is associated with peak BMD in men. J Bone Miner Res 2004 Dec;19(12):2005-11.

371. Koh JM, Jung MH, Hong JS, et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. J Korean Med Sci 2004 Jun;19(3):407-412.

372. Ferrari SL, Karasik D, Liu J, Karamohamed S, Herbert AG, Cupples LA, Kiel DP. Interactions of interleukin-6 promoter polymorphisms with dietary and lifestyle factors and their association with bone mass in men and women from the Framingham Osteoporosis Study. J Bone Miner Res 2004 Apr;19(4):552-559.

373. Lau EM, Wong SY, Li M, Ma CH, Lim PL, Woo J. Osteoporosis and transforming growth factor-beta-1 gene polymorphism in Chinese men and women. J Bone Miner Metab 2004;22(2):148-52.

374. Alvarez-Hernandez D, Naves M, Diaz-Lopez JB, Gomez C, Santamaria I, Cannata-Andia JB. Influence of polymorphisms in VDR and COLIA1 genes on the risk of osteoporotic fractures in aged men. Kidney Int Suppl 2003 Jun;(85):S14-8.

375. Strandberg S, Nordstrom P, Lorentzon R, Lorentzon M. Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) is related to bone mineral density in healthy adolescent boys. J Bone Miner Metab 2003;21(2):109-13.

376. Koh JM, Kim DJ, Hong JS, Park JY, Lee KU, Kim SY, Kim GS. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms Pvu II and Xba I influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men. Eur J Endocrinol 2002 Dec;147(6):777-783.

377. Peris P, Alvarez L, Oriola J, Guanabens N, et al. Collagen type Ialpha1 gene polymorphism in idiopathic osteoporosis in men. Rheumatology (Oxford) 2000 Nov;39(11):1222-5.

378. Labuda, M.; Ross, M. V.; Fujiwara, T. M.; Morgan, K.; Ledbetter, D.; Hughes, M. R.; Glorieux, F. H. : Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q.II (Abstract) Cytogenet. Cell Genet 1978;58: 1991.

379. Kusec V, Virdi AS, Prince R, Triffitt JT. Estrogen receptor localisation in human and rabbit skeletal tissue. J Clin Endocrinol Metab 1998;83: 2421-2428.

380. Oreffo RO, Kusec V, Virdi AS, Flanagan AM, Grano M, Zambonin-Zallone A, Triffitt JT. Expression of estrogen receptor-alpha in cells of the osteoclastic lineage. Histochem Cell Biol 1999;111(2):125-133.

381. Oreffo ROC, Kusec V, Romberg S, Triffitt JT. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. J Cell Biochem 1999;75(3):382-392.

382. Retief E, Parker MI, Retief AE.Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (COLIA2 and COLIA1). Hum Genet. 1985;69(4):304-308

383. Matsushita H, Kurabayashi T, Tomita M, Tanaka K. Effects of vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms on the changes in lumbar bone mineral density with multiple pregnancies in Japanese women. Hum Reprod. 2004 Jan;19(1):59-64.

384. Lau HH, Ng MY, Ho AY, Luk KD, Kung AW. Genetic and environmental determinants of bone mineral density in Chinese women. Bone. 2005 Apr;36(4):700-709.

385. Han K, Choi J, Moon I, Yoon H, Han I, Min H, Kim Y, Choi Y. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri-, and postmenopausal women. Osteoporos Int. 1999;9(4):290-5.

386. Harris SS, Eccleshall TR, 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 Jul;12(7):1043-8.

387. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour JP. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. J Bone Miner Res. 1998 Jun;13(6):925-930.

388. Hustmyer FG, Liu G, Johnston CC, Christian J, Peacock M Polymorphism at an Sp1 binding site of COL1A1 and bone mineral density in premenopausal female twins and elderly fracture patients. Osteoporos Int. 1999;9(4):346-350.

389. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. Calcif Tissue Int. 2002 Jul;71(1):26-35.

390. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H.Association of a -1997G-->T polymorphism of the collagen Ialpha1 gene with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. Hum Biol. 2005 Feb;77(1):27-36.

391. Perrotta S, Cappellini MD, Bertoldo F, et al. Osteoporosis in beta-thalassaemia major patients: analysis of the genetic background. Br J Haematol 2000 Nov;111(2):461-466.

392. Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T, et. al. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. Kidney Int. 1998 Feb;53(2):454-458.

393. Akiba T, Ando R, Kurihara S, Heishi M, Tazawa H, Marumo F. Is the bone mass of hemodialysis patients genetically determined? Kidney Int Suppl 1997 Nov;62:S69-71.

394. Torres A, García S, Gómez A, et al. Treatment with intermittent calcitriol and calcium reduces bone loss after renal transplantation. Kidney Int 2004 Feb;65(2):705-712.

395. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. Osteoporos Int 1998;8(3):204-10.

396. Hampson G, Evans C, Petitt RJ, Evans WD, Woodhead SJ, Peters JR, Ralston SH. Bone mineral density, collagen type 1 alpha 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. Diabetologia 1998 Nov;41(11):1314-1320.

397. Li Y, Xu L, Shen L, Yu L, Chen L. Relationship between glucocorticoid-induced osteoporosis and vitamin D receptor genotypes. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2002;22(4):317-9, 323.

398. Ho YV, Briganti EM, Duan Y, Buchanan R, Hall S, Seeman E. Polymorphism of the vitamin D receptor gene and corticosteroid-related osteoporosis. Osteoporos Int. 1999;9(2):134-138.

399. Ozisik G, Mergen H, Ozata M, et al. Vitamin d-receptor gene polymorphisms and vertebral bone density in men with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. Med Sci Monit 2001 Mar-Apr;7(2):233-237.

400. Rass P, Pakozdi A, Lakatos P, Zilahi E, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis and associated osteoporosis. Rheumatol Int 2006 Sep;26(11):964-71.

401. Gough A, Sambrook P, Devlin J, et al. Effect of vitamin D receptor gene alleles on bone loss in early rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1998 May;25(5):864-868.

402. Takagi H, Ishiguro N, Iwata H, Kanamono T. Genetic association between rheumatoid arthritis and estrogen receptor microsatellite polymorphism. J Rheumatol 2000 Jul;27(7):1638-1642.
403. Masi L, Cimaz R, Simonini G, et al. Association of low bone mass with vitamin d receptor gene and calcitonin receptor gene polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol 2002 Oct;29(10):2225-2231.
404. Obermayer-Pietsch BM, Lange U, Tauber G, et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism, bone density and inflammatory activity of patients with ankylosing spondylitis. Osteoporos Int 2003 Dec;14(12):995-1000.
405. Pares A, Guanabens N, Rodes J. Gene polymorphisms as predictors of decreased bone mineral density and osteoporosis in primary biliary cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005 Mar;17(3):311-315.
406. Lakatos PL, Bajnok E, Tornai I, et al. Insulin-like growth factor I gene microsatellite repeat, collagen type Ialpha1 gene Sp1 polymorphism, and bone disease in primary biliary cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004 Aug;16(8):753-759.
407. Lakatos PL, Bajnok E, Tornai I, et al. Decreased bone mineral density and gene polymorphism in primary biliary cirrhosis. Orv Hetil 2004 Feb 15;145(7):331-336.
408. Lakatos LP, Bajnok E, Hegedus D, Toth T, Lakatos P, Szalay F. Vitamin D receptor, oestrogen receptor-alpha gene and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Hungarian patients with primary biliary cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002 Jul;14(7):733-740.
409. Pares A, Guanabens N, Alvarez L, et al. Collagen type Ialpha1 and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mass in primary biliary cirrhosis. Hepatology 2001 Mar;33(3):554-560.
410. Springer JE, Cole DE, Rubin LA, et al. Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 2000 Jan;118(1):145-151.
411. Guardiola J, Xiol X, Sallie R, Nolla JM, Roig-Escofet D, Jaurrieta E, Casais L. Influence of the vitamin D receptor gene polymorphism on bone loss in men after liver transplantation. Ann Intern Med 1999 Nov 16;131(10):752-755.
412. Bregenzer N, Schaffler A, Gelbmann CM, Steinkamp M, Reinshagen M, Scholmerich J, Andus T. Lack of correlation between the vitamin D receptor FokI start codon

polymorphism and bone mineral density in patients with Crohn's disease. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2006 Jan;114(1):1-5.

413. 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 Nov;54(11):1579-1584.
414. Schulte CM, Dignass AU, Goebell H, Roher HD, Schulte KM. Genetic factors determine extent of bone loss in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000 Oct;119(4):909-920.
415. Moreno ML, Crusius JB, Chernavsky A, et al. The IL-1 gene family and bone involvement in celiac disease. Immunogenetics 2005 Sep;57(8):618-620.
416. Vogelsang H, Suk EK, Janisiw M, Stain C, Mayr WR, Panzer S. Calcaneal ultrasound attenuation and vitamin-D-receptor genotypes in celiac disease. Scand J Gastroenterol 2000 Feb;35(2):172-176.
417. Saibeni S, Lecchi A, Meucci G, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in adult gluten-sensitive enteropathy at diagnosis: role of B12, folate, and genetics. Clin Gastroenterol Hepatol 2005 Jun;3(6):574-580.
418. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. J Bone Miner Res 2004 Jan;19(1):42-47.
419. Enattah N, Valimaki VV, Valimaki MJ, Loyttyniemi E, Sahi T, Jarvela I. Molecularly defined lactose malabsorption, peak bone mass and bone turnover rate in young finnish men. Calcif Tissue Int 2004 Dec;75(6):488-493.
420. Enattah N, Pekkarinen T, Valimaki MJ, Loyttyniemi E, Jarvela I. Genetically defined adult-type hypolactasia and self-reported lactose intolerance as risk factors of osteoporosis in Finnish postmenopausal women. Eur J Clin Nutr 2005 Oct;59(10):1105-1111.
421. Obermayer-Pietsch BM, Fruhauf GE, Chararas K, Mikhail-Reinisch S, Renner W, Berghold A, Kenner L, Lackner C Association of the vitamin D receptor genotype BB with low bone density in hyperthyroidism. *J Bone Miner Res* 2000.Oct;15(10):1950-1955.
422. Ban Y, Taniyama M, Ban Y. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' Disease in the Japanese population. J Clin Endocrin Metab 2000;85(12): 4639-4643.

423. Vasudevan N, Ogawa S & Pfaff D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. Physiological Reviews 200282 923–944.
424. Rae MT, Gubbay O, Kostogiannou A, Price D, Critchley HO, Hillier SG. Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jan;92(1):322-732.
425. Zhu YS, Yen PM, Chin WW, Pfaff DW. Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 1996 Oct 29;93(22):12587-12592.
426. Moore JM, Galicia SJ, McReynolds AC, Nguyen NH, Scanlan TS, Guy RK. Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions. J Biol Chem 2004 Jun 25;279(26):27584-27590.
427. Fujimoto N, Jinno N, Kitamura S. Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. J Endocrinol. 2004 Apr;181(1):77-83.
428. Zhu YS, Cai LQ, You X, Duan Y, Imperato-McGinley J, Chin WW, Pfaff DW. Molecular analysis of estrogen induction of preproenkephalin gene expression and its modulation by thyroid hormones. Brain Res Mol Brain Res. 2001 Jul 13;91(1-2):23-33.
429. Pepper B, Farid NR. Polymorphic variants of the third component of complement in Graves' disease.Hum Hered 1979;29(5):279-283.
430. Noel EP, Sampson L, Pepper BM, Farid NR. Polymorphism of the second component of complement (C2) in Graves' disease.Hum Hered 1980;30(4):245-247.
431. Wenzel KW, Wenzel BE, Weise W. Properdin factor Bf polymorphism and glyoxase I allotypes in Graves' disease. Tissue Antigens 1981 Feb;17(2):247-248.
432. Rechavi G, Givol D, Geltner D. Polymorphism of human immunoglobulin VH genes: a possible marker of autoimmune disease.Dis Markers. 1987 Sep;5(3):171-176.
433. Demaine A, Welsh KI, Hawe BS, Farid NRPolymorphism of the T cell receptor beta-chain in Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 1987 Oct;65(4):643-646.
434. Ratanachaiyavong S, Lloyd L, McGregor AM. C4A gene deletion: association with Graves' disease. J Mol Endocrinol 1989 Sep;3(2):145-153.
435. Bikker H, Bolhuis PA, Vassart G, Libert F, Massaro G, de Vijlder JJ. Eco RI RFLP in the human thyroid peroxidase (TPO) gene on chromosome 2. Hum Genet 1989 Apr;82(1):95.

436. Ganly PS, Rabbitts PH. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of MspI and DraI polymorphism at the THRB gene. Nucleic Acids Res 1991 Jul 11;19(13):3760.
437. Sakurai A, Bell GI, DeGroot LJ. Dinucleotide repeat polymorphism in the human thyroid hormone receptor beta gene (THRB) on chromosome 3. Nucleic Acids Res 1991 Dec 11;19(23):6661.
438. Sale MM, Akamizu T, Howard wt al. Association of autoimmune thyroid disease with a microsatellite marker for the thyrotropin receptor gene and CTL-4 in Japanese population. Proc Assoc Am Physicans 1997 Sep;109(5):453-461.
439. Akamizu T, Sale MM, Rich SS et al. Association of autoimmune thyroid disease with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTL-4 in Japanese patients. Thyroid 2000 Oct;10(10):851-858.
440. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. Clin Endocrinol (Oxf) 2004 Aug; 61(2):263-268.
441. Ban Y, Taniyama M, Tozaki T, Yanagawa T, Tomita M, Ban Y. SEL1L microsatelite polymorphism in Japanese patients with autoimmune thyroid diseases. Thyroid 2001 Apr;11(4):335-338.
442. Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib pair linkage analysis in Japanese. Hum Mol Genet 2001 Jun 15;10(13):1379-1386.
443. Akamizu T, Hiratani H, Ikegami S, Rich SS, Bowden SW. Association study of autoimmune thyroid disease at 5q23-q33 in Japanese patients. J Hum Gent 2003;48(5):236-242.
444. Villanueva R, Tomer Y, Greenberg DA, et al. Autoimmune thyroid disease susceptability loci in a large Chinese family. Clin Endocrinol (Oxf) 2002 Jan;56(1):45-51.
445. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. A new Graves disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. International Consortium for the Genetics of autoimmune thyroid disease. Am J Hum Genet 1998 Dec;63(6):1749-1756.

446. Barbesino G, Tomer Y, Conception ES, Davies TF, Greenberg DA. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. II. Selected-gender-related genes and the X-chromosome. J Clin Endocrinol Metab 1998;83(9):3290-3295.
447. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Conception E, Davies TF, and the International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. III. Detailed analysis of chromosome 14 localizes Graves' Disease-1 (GD-1) close to multinodular goiter-1 (MNG-1). J Clin Endocrinol Metab 1998;83(12):4321-4327.
448. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Conception E, Davies TF. Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimoto's diseases: Evidence for genetic heterogeneity and gene interactions. J Clin Endocrinol Metab 1999 Dec;84(12):4656-4664.
449. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a CTLA-4 5' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. Autoimmunity 2005 Mar;38(2):151-153.
450. Yanagawa T, Taniyama M, Enomoto S, et al. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. Thyroid 1997 Dec;7(6)843-846.
451. Collins JE, Heward JM, Nithiyanantan R, Nejentsev S, Todd JA, Franklin JA, Gough SCL. Lack of association of the vitamin D receptor gene with Graves' disease in UK caucasians. Clinical Endocrinol 2004;60:618-624.
452. Štefanić M, Karner I, Glavaš-Obrovac LJ, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with susceptibility to Graves' disease in eastern Croatian population: case-control study. Croat Med J 2005;46(4):639-646.
453. Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarszuk T, Paunkovic J, Seidi C, Badenhoop K. Vitamin D receptro polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. Thyroid 2005 Oct;15(10):1125-1130.
454. Chen RH, Chang CT, Chen HY, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ.Association between vitamin-D receptor gene FokI polymorphism and Graves' disease among Taiwanese Chinese. J Clin Lab Anal. 2007;21(3):173-177.
455. Ban Y, Taniyama M, Tozaki T, Tomita M, Ban Y. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat polymorphism in Japanese patients with autoimmune thyroid disease. BMC Medical Genetics 2000 Nov 23; 2000;1:1.

456. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Lack of association between estrogen receptor beta dinucleotide repeat polymorphism and autoimmune thyroid diseases in Japanese patients. BMC Med Genet. 2001;2:1.
457. Wang S, Mao S, Zhao G, Wu H. Relationship between estrogen receptor and Graves' disease. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2000 Aug;38(8):619-21.
458. Francis RM, Harrington F, Turner E,Papiha S, Datta HK. Vitamin D receptor gene polymorphism in men and its effect on bone density and calcium absorption. Clin endocrinol 1997; 46:83-86.
459. Gough A, Sambrook P, Devlin J, Lilly J, Huisoon A, Betteridge J et al. effect of Vitamin D receptor gene alleles on bone loss in early rheumatoid arthritis. J of Rheumatology 1998; 25: 864-868.
460. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone desnity and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type Iα1 gene Nature genetics 1996;14:203-205.
461. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. J Bone Min Res 1996;11:306-311.
462. De Rosa G, Testa A, Maussier ML, Callà C, Astazi P, Albanese C. A slightly suppressive dose of L-thyroxine does not affect bone turnover and bone mineral density in pre- and postmenopausal women with nontoxic goitre. Horm Metab Res. 1995 Nov;27(11):503-507.

12. POPIS KRATICA

skraćenica	engleski	hrvatski
aBMD	areal BMD	površinski BMD
BMD	bone mineral density	mineralna gustoća kosti
COLIA1	collagen I alpha 1	alfa 1 lanac kolagena tipa I
DBP	vitamin D binding protein	protein koji veže vitamina D
DXA	duel x-ray absorptiometry	apsorpciometrija x-zrakama dvostruke energije
ER	estrogen receptor	receptor za estrogene
ERE	estrogen response element	element koji reagira na estrogen
ITM	-	indeks tjelesne mase
PCR	polymerase chain reaction	lančana reakcija polimeraze (kojom se umnožava dio odsječka gena koji nosi potencijalno restrikcijsko mjesto)
RANK	receptor activator of nuclear factor-B	cirkulirajuća molekula koja se veže za receptor koji aktivira nuklerani čimbenik-B
RANKL	receptor activator of nuclear factor-B (RANK) ligand	cirkulirajuća molekula koja se veže za receptor koji aktivira nuklerani čimbenik-B
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polimorfizam duljine fragmenata DNA nastalih rezanjem restrikcijskim enzimima
RXR	retinoid X receptor	reetinoidni X receptor
SNP	single nucleotide polymorphisim	polimorfizam jednog nukteotida
TRE	tiroxine response element	element koji reagira na tiroksin
vBMD	volumetric BMD	volumetrijski BMD
VDR	vitamin D receptor	receptor za vitamin D
VDRE	vitamin D response element	element koji reagira na vitamin D
QTL	quantitative trait loci	kvantitativno ispitivanje povezanosti lokusa

13. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17.3.1957. g. u Bosanskom Brodu. Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1981. g. Nakon toga zaposlio sam se u Domu zdravlja u Bosanskoj Dubici. Specijalizaciju interne medicine završio sam u Kliničkom bolničkom centru u Zagrebu, a specijalistički ispit položio sam 1991. g. Poslijediplomski studij iz Alergologije i kliničke imunologije, završio sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, (prosječna ocjena: 4.96) u periodu 1986-1987. g. Magisterijsku radnju na temu: "Humoralna imunološka reaktivnost radnika izloženih prašini pamuka" obranio sam 1993. god. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Mentor mi je bio prof. dr. sc. Branimir Čvoriščec. Ispit iz uže specijalizacije iz endokrinologije i dijabetesa položio sam 2003. g. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1992-1993 i ponovno od 1999. g. zaposlen sam u Zavodu za endokrinologiju KBC Zagreb. Područja posebnog interesa su mi osteoporoza i debljina.

Posebne vještine i edukacija:

Završio sam tečaj iz denzitometrije, Hologic, Zagreb, 1998. g., a iste godine završio sam i poslijediplomski tečaj "Ultrazvuk štitnjače" u KB Merkur, Zagreb. Godine 2001. proveo sam mjesec dana na studijskom boravku u Sveučilišnoj klinici Hamburg – Eppendorf u sklopu suradnje medicinskih fakulteta Hamburg-Zagreb. Sudjelovao sam na tečaju "Managing obesity – clinical practice update" 2003. god. u Madridu.

Sudionik sam brojnih domaćih i međunarodnih skupova i kongresa, na kojima sam aktivno sudjelovao. Objavio sam 7 članaka u stručnim i znanstvenim publikacijama, 4 članka u knjigama, 3 u zbornicima radova, 3 u priručnicima za pacijente i 46 kongresnih priopćenja. Pozvani predavač bio sam na 17 kongresa, održao sam više predavanja u sklopu poslijediplomske i dodiplomske nastave, te stručnih sastanaka, te sam sudjelovao na više „okruglih stolova" i javnih tribina. Član sam više domaćih i međunarodnih strukovnih organizacija.

14. DODACI: SUGLASNOST ISPITANIKA ZA SUDJELOVANJE U ISPITIVANJU.

PRILOG 1.

INFORMACIJA ZA ISPITANIKE

UVOD

Osteoporoza predstavlja najčešću metaboličku bolest koštanog sustava. Karakterizirana je malom koštanom masom i poremećajem arhitektonike kosti, što uzrokuje povećanu krhkost kosti i povećan rizik prijeloma. Oko 8 % ukupnog stanovništva zemalja razvijenog svijeta boluje od osteoporoze. Najčešća je u postmenopauzalnoj dobi. Oko 40% žena u postmenopauzalnoj dobi do kraja života doživjet će prijelom neke kosti. Osim postmenopauzalne osteoporoze postoje i brojni drugi oblici takozvane sekundarne osteoporoze, među koje se ubraja i osteoporoza uzrokovana hipertireozom. Poznati su različiti nenasljedni čimbenici rizika vezani za stil života i prehranu, utjecaje iz okoliša, te različite bolesti. Međutim, nenasljedni čimbenici rizika nisu jedini koji utječu na koštanu masu. Oko 70-90% koštane mase zdravih osoba je genetski predodređeno. Dosadašnja ispitivanja su pokazala da polimorfizmi nekih gena također utječu na veličinu gubitka koštane mase u bolesnika s osteoporozom i da neki genski aleli predstavljaju čimbenike rizika za nastanak osteoporoze. Međutim, rezultati ispitivanja nisu uvijek bili jednoznačni. Do sada je ispitivan pojedinačni utjecaj jednog ili najviše 2 gena istovremeno na koštanu masu i rizik nastanka osteoporoze. Nije bilo ispitivanja utjecaja genskog polimorfizma u bolesnika s hipertireozom na koštanu masu i rizik nastanka osteoporoze.

Planirano je ispitati odnos koštane mase i polimorfizma 3 gena koji utječu na koštanu masu u bolesnika s hipertireozom.

PLAN I OPIS ISPITIVANJA

Učiniti će se denzitometrija kosti i genetske analize, a potom rezultati analizirati u cilju otkrivanja moguće veze između polimorfizma jednog ili više gena i veličine koštane mase, odnosno rizika nastanka osteoporoze u bolesnika s hipertireozom..

1. Denzitometrija je sigurna i pouzdana neinvazivna pretraga kojom se može precizno izmjeriti koštana masa i dijagnosticirati osteoporoza. Obzirom da je hipertireoza poznati rizik za nastanak tzv. sekudarne osteoporoze pretraga je indicirana za rano otkrivanje osteopenije i osteoporoze uzrokovane hipertireozom. Metoda koristi minimalnu, potpuno bezopasnu količinu X-zraka od 1-3 mRem-a, što odgovara dozi kozmičkog zračenja koju ljudi prosječno prime na površini Zemlje u trajanju od 3-9 dana, ili putnici u avionu u trajanju od 3-9 sati. To je doza zračenja oko 100x manja nego kod rtg snimanja srca i pluća. Zračenje je tako malo da se ni medicinsko osoblje koje radi s pacijentom ne štiti. Pretraga traje 5-15 minuta, jednostavna je i ugodna (bolesnik samo sjedi ili leži na stolu).
2. Genetske pretrage. Za genetske pretrage koristiće se leukociti iz venske krvi. Radi toga je potrebno izvaditi 7 ml venske krvi. Ispitanici neće biti posebno podvrgavani ubodu i vađenju krvi, nego će se to učiniti istovremeno prilikom rutinskog redovitog vađenja krvi za redovite kontrolne preglede razine hormona štitnjače u krvi (T3, T4, TSH) tijekom praćenja učinka liječenja hipertireoze, osim ako na to posebno pristanu.

PRILOG 2.

PRISTANAK NA ISPITIVANJE

Ispitanik ..... je iscrpno upoznat sa razlogom i načinom ispitivanja, metodama, rizicima i uz mogućnost prigovora i odustajanja od ispitivanja u bilo kojem trenutku, **pristaje na ispitivanje**.

U Zagrebu .....200 . godine

Potpis ispitivača **Potpis ispitanika**

....