Učinkovitost sevelamera na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze

Drača, Nataša

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:105:821809

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Drača, Nataša (2013) ***Učinkovitost sevelamera na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze [The effect of sevelamer on the bone volume in the rat model of osteoporosis].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1979

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša Drača

Učinkovitost sevelamera na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša Drača

Učinkovitost sevelamera na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, proteomske analize izrađene su u suradnji s Genzyme Corporation, Framingham, Massachusetts; biomehanička testiranja u suradnji s Fakultetom strojarstva i brodogradnje, Sveučilišta u Zagrebu te Prehrambeno-biotehnološkim fakultetom, Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Slobodan Vukičević

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću te cijelom Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također zahvaljujem prof. dr.sc. Nikici Gabriću, prof. dr.sc. Ivi Dekaris te dr.sc. Ratimiru Laziću i svim zaposlenicima Klinike Svjetlost na podršci pri izradi disertacije.

Popis oznaka i skraćenica

αMEM	-	minimalni esencijalni medij alfa (engl. Alfa Minimal Essential Medium)
µCT	-	mikrokompjutorizirana tomografija
∑	-	snaga
CAN	-	akrilnitrat
ALP	-	alkalna fosfataza
ATP	-	adenozin trifosfat
BAP	-	koštana alkalna fosfataza (engl. Bone Alkaline Phosphatase)
BFR	-	brzina stvaranja kosti (engl. Bone Formation Rate)
BMD	-	mineralna gustoća kosti (engl. Bone Mineral Density)
BMPs	-	koštani morfogenetski proteini (engl. Bone Morphogenetic Proteins)
BS	-	koštana površina (engl. Bone Surface)
BV	-	volumen spužvaste kosti (engl. Bone Volume)
Ca	-	kalcij
CRP	-	C reaktivni protein
CKD	-	kronična bubrežna bolest (engl.Chronic Kidney Disease)
CO_3	-	karbonat
DXA	-	dvoenergetska apsorpciometrija X zraka
EIA	-	enzimski imunoesej (engl.Enzyme Immunoassay)
ELISA	-	engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERSD	-	zadnja faza bubrežnog zatajenja (engl.End Stage Renal Disease)
FCS	-	fetalni goveđi serum (engl.Fetal Calf Serum)
FDA	-	Američka uprava za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration)
FGF	-	faktor rasta fibroblasta (engl. Fibroblast Growth Factor)
Fu	-	maksimalno opterećenje
GF	-	glomerularna filtracija
GTP	-	gvanozin trifosfat
HCl	-	hidroklorid
HD	-	hemodijaliza
HDL	-	lipoproteini visoke gustoće (eng. High Density Lipoprotein)
HNL	-	hormonsko nadomjesno liječenje
HPLC	-	engl.High-Performance Liquid Chromatography
IGF	-	čimbenik rasta sličan inzulinu (engl. Insulin Like Growth Factor)
i.v.	-	intravenski

IL	-	interleukin
LDL	-	lipoprotein niske gustoće (Engl. Low Density Lipoprotein)
M	-	mol
M-CSF	-	engl. Macrophage Colony Stimulating Factor
Mg	-	magnezij
MS	-	masena spektrometrija
MAR	-	brzina odlaganja minerala (engl. Mineral Apposition Rate)
OVX	-	ovarijektomija
P	-	anorganski fosfor u serumu
PBS	-	fiziološka otopina s fosfatima (engl.Phosphate Buffered Saline)
pQCT	-	periferna kvantitativna kompjutorizirana tomografija
PTH	-	parathormon, paratiroidni hormon
RANKL	-	engl. Receptor Activator of Nuclear factor KB Ligand
S	-	čvrstoća (engl.Stiffness)
s.c.	-	subkutano
SC	-	matične stanice (engl.Stem Cells)
SD	-	standardna devijacija
SDS-PAGE	-	engl. Sodium Dodecyle Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SE	-	sedimentacija
SELDI-TOF	-	engl. Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
SEM	-	srednja standardna pogreška
SERM	-	selektivni modulatori estrogenskih receptora
SMI	-	indeks strukturalnog modela
T	-	rigidnost (engl.Toughness)
Tb. N.	-	broj trabekula (engl. Trabecular Number)
Tb. Sp.	-	trabekularni razmak (engl. Trabecular Separation)
Tb. Th.	-	debljina trabekula (engl. Trabecular Thickness)
TBPf	-	činitelj oblika trabekularne kosti (engl. Trabecular Bone Patern Factor)
TGF-β	-	transformirajući faktor rasta beta (engl. Transforming Growth Factor β)
TNF-α	-	faktor nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor alfa)
TRAP	-	tartarat rezistentna kisela fosfataza (engl.Tartrate Resistant Acid Phosphatase)
W	-	apsorbirana energija

1. UVOD 1

1.1. OSTEOPOROZA 1

1.1.1. Definicija i epidemiologija 1

1.1.2. Etiologija 4

1.1.2.1. Faktori rizika 4

1.1.2.2. Estrogen i kost 5

1.1.3. Klasifikacija osteoporoze 6

1.1.4. Dijagnostika i liječenje osteoporoze 9

1.1.4.1. Simptomi osteoporoze 9

1.1.4.2. Postavljanje dijagnoze 9

1.1.4.3. Liječenje osteoporoze 10

1.1.4.3.1. Antiresorptivni lijekovi 12

1.1.4.3.1.1. Estrogeni. 12

1.1.4.3.1.2. Selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM) 13

1.1.4.3.1.3. Bisfosfonati 14

1.1.4.3.1.4. Kalcitonin 15

1.1.4.3.1.5. Flavonidi 15

1.1.4.3.2. Osteoanabolici 16

1.1.4.3.2.1. Paratiroidni hormon (PTH) 16

1.1.4.3.2.2. Fluorid 16

1.1.4.3.2.3. Stroncijev ranelat 17

1.1.4.3.3. Potencijalni lijekovi 18

1.1.4.3.3.1. Peptaidni čimbenici rasta 18

1.1.4.3.3.2. Inhibitori proteasoma 18

1.1.4.3.3.3. Leptin 19

1.1.5. ŽIVOTINJSKI MODEL OSTEOPOROZE 19

1.1.6. KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA I KOST 20

1.2. SEVELAMER HIDROKLORID (RENAGEL®) 23

2. HIPOTEZA 26
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 27
4. MATERIJALI I METODE 28
4.1. POKUSNE ŽIVOTINJE I PROTOKOL 28
4.2. In vivo i ex vivo mjerenje koštane mineralne gustoće (BMD) metodom denzitometrije (DXA) 29
4.3. Periferna kvantitativna i mikrokompjuterizirana tomografija (PQCT i MicroCT) 31
4.4. Histologija i histomorfometrija 32
4.5. Biomehaničko testiranje 32
4.6. Stanična kultura 34
4.7. Biokemijski parametri u serumu 35
4.8. Proteomika 35
4.9. Statistička analiza 37
5. REZULTATI 38
5.1. Sevelamer vraća izgubljenu kost u OVX štakora 38
5.2. Sevelamer utječe na aktivnost osteoblasta i osteoklasta u koštanoj srži 44
5.3. Serumska biokemija 46
5.4. Proteomska analiza 47
5.5. Sevelamer povećava koštanu masu u sham štakora 50
5.5.1. Biomehanički pokazatelji djelovanja sevelamera u sham životinja 51
6. DISKUSIJA 52
7. ZAKLJUČCI 56
7.1. Znanstveni doprinos 59
8. SAŽETAK 60
9. SUMMARY 63
10. LITERATURA 64
11. ŽIVOTOPIS 75

1 UVOD

1.1 *OSTEOPOROZA*

1.1.1 DEFINICIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Osteoporoza je najčešća metabolička bolest kostiju, koja se zbog svoje velike učestalosti te neprimjetne simptomatologije naziva i “tiha epidemija” (1). Osteoporoza je rezultat neravnoteže u koštanoj pregradnji zbog čega dolazi do smanjenja gustoće kostiju te one postaju porozne. Tijekom odrasle dobi koštani sustav čovjeka neprestano se pregrađuje (3 do 5% godišnje). Ako se koštana razgradnja i stvaranje kosti pravilno ne nadopunjuju, dolazi do neravnoteže u pregradnji kosti, što postupno uzrokuje trajan gubitak mineralne gustoće kosti. Najviše se gubi spongiozna kost kralješnice i distalnog dijela palčane kosti u žena, te kralješnice i vrata bedrene kosti u žena i muškaraca (1). Ako je razlika između brzine stvaranja i razgradnje konstantna, značajno smanjenje koštane mase može dovesti do nastanka koštanih prijeloma jer oslabljena kost ne može izdržati normalne mehaničke sile kojima je izložena (2).

Prema dijagnostičkim kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (T-score ≤-2,5; T score = odstupanje, u standardnim varijacijama, od referentnih vrijednosti koštane mase za mlade odrasle osobe), procjenjuje se da 15 % bijelog stanovništva starijeg od 50 godina i čak 70 % starijeg od 80 godina ima osteoporozu (3). Prema istom izvoru podataka 10,3 % ukupnog stanovništva Sjedinjenih Američkih Država (SAD-a) ima osteoporozu. Čak 30 % bijelih žena u postmenopauzi ima osteoporozu, a 54 % osteopeniju (4). U svijetu je veća učestalost bolesti nađena u stanovništvu azijskih zemalja, dok je u Australiji učestalost manja u odnosu na europsko i sjevernoameričko stanovništvo bijele rase (Tablica1). Općenito, učestalost osteoporoze među bijelim stanovništvom Europe i

SAD-a kreće se između 10 % i 15 %, dok među ženskim stanovništvom Azije (Jordan, Kina) iznosi i do 30 % (1). U Hrvatskoj je od 1995. godine broj prijavljenih slučajeva osteoporoze i osteomalacije od primarne zdravstvene zaštite, u odnosu na ukupan broj prijavljenih bolesti, bio u stalnom porastu i iznosio je od 0,24 % u 1995.godini do 0,70 % u 2004. godini, što djelomice odgovara i poboljšanju dijagnostičkih mogućnosti zdravstvenih ustanova u tom razdoblju (1). U epidemiološkoj studiji utemeljenoj na ultrazvučnoj denzitometriji i provedenoj u nekoliko županija u Hrvatskoj, osteoporoza je utvrđena u 38,6 % ispitanika, a osteopenija u 45,4 % ispitanika, od kojih su 95,2 % bile žene, prosječne dobi od 60 godina (5). U muškaraca je u dobi od 20 do 99 godina pokazano da 16,2 % muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu te da se vršne vrijednosti koštane mase postižu u trećem desetljeću života (6).

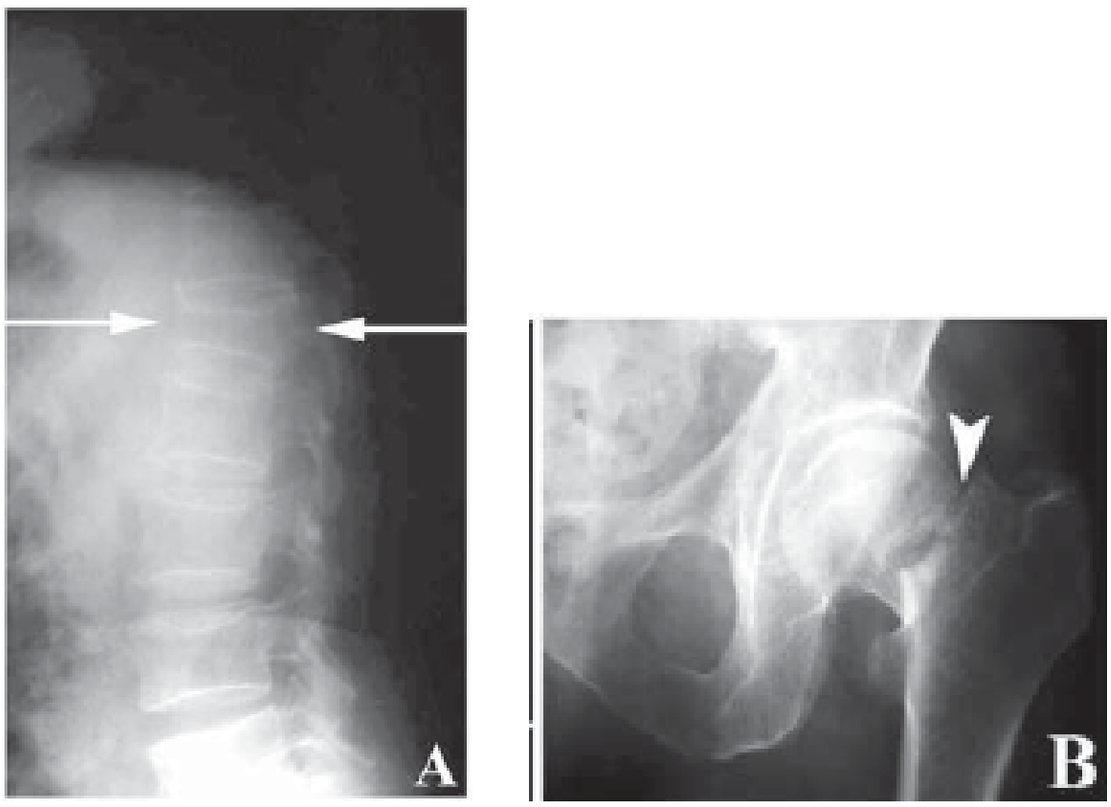
Tablica 1. *Epidemiološka istraživanja o osteoporozi u svijetu (1).*

Zemlja	Prevalencija osteoporoze
Jordan	
Žene N=3529; dob 20 do 90 god.	29,6 %
Kina	
Žene N=3406; dob 10 do 90 god.	32,1 % kralježnica; 16,3 % kuk
Gradska populacija N=5593; dob >40 god.	Žene: 19,9 %; Muškarci: 11,5 %
Taiwan	
Žene N=3529; dob 20 do 90 god.	10,8 % kralježnica; 7,5 % kuk
SAD (NHANES III)	
Dob>0 god.	Kuk: Žene: 13% do 18 %; Muškarci: 3% do 6 %
Kanada	
Uzorak populacije N=10061; dob >25 god.	Žene: 15,8 %; Muškarci: 6,6 %
Australija	
Žene N=1494; dob 20 do 94 god.	Kralježnica, kuk, podlaktica: 40 do 44 god.: 0,9 % i > 79 god.: 87 %
Bugarska	
Žene N=8869; dob 20 do 87 god.	Podlaktica: 15,2 %
Španjolska	
Žene, dob 20 do 79 god.	11,3 % kralježnica; 4,3 % kuk
Velika Britanija	Kralježnica, kuk, podlaktica:
Žene N=8789; dob 33 do 73 god.	30 do 35 god.: 0 % i >70 god. : 30 %

Najozbiljnija su komplikacija osteoporoze prijelomi kostiju koji najčešće nastaju na kralješcima, kuku i podlaktici (1). Također su česte su i mikrofrakture.

U okviru međunarodne studije European Vertebral Osteoporosis Study (EVOS), u uzorku ispitanika iz Zagreba utvrđena je standardizirana stopa prijeloma kralješaka u 16,3 % muškaraca i 14,8 % žena, srednje dobi oko 60 godina (7). U nastavku ove studije (European Prospective Osteoporosis Study -EPOS) utvrđeno je da incidencija prijeloma podlaktice u žena u istočnoj Europi, uključujući Hrvatsku, odgovara onoj u skandinavskim zemljama, u kojima je najveća incidencija svih prijeloma ekstremiteta, uključujući kuk (8). Osteoporoza obično postaje klinički problem nakon prijeloma.

Slika 1. *Osteoporotični prijelom trupa kralješka (A) i vrata bedrene kosti (B) kod 68-godišnje pacijentice (9).*



1.1.2 ETIOLOGIJA

1.1.2.1 Faktori rizika

Postoji nekoliko glavnih kategorija rizičnih čimbenika: životna dob, naslijeđe, životne navike, postojanje kroničnih bolesti i hormonskih poremećaja te fizikalna obilježja kosti. Utjecaj pojedinog rizičnog čimbenika ovisi o životnoj dobi u kojoj se pojavljuje. Na primjer, nedostatak estrogena u adolescentnoj i mladoj životnoj dobi ima vrlo ozbiljne posljedice na razvoj skeleta, dok u dobi iznad 50 godina, taj učinak može biti i nezamjetan (1). Također bitnu ulogu ima i spol. Bolest je češća u žena u odnosu na muškarce iste životne dobi. Zbog gubitka estrogena u žena u postmenopauzi, razlike po spolu bitno se povećavaju iza 50. godine. Manjak estrogena bilo kojeg porijekla (prirodna ili umjetna menopauza, amenoreja) dovodi do ubrzanog gubitka koštane mase, što pokazuje da estrogeni imaju glavnu ulogu u prevenciji gubitka kosti. Fizikalna obilježja i genetske predispozicije pojedinca također su etiološki značajne. Osobe s manjom mišićnom masom i manjom prosječnom tjelesnom težinom češće imaju osteoporozu. Nadalje, smatra se da genetski čimbenici najvećim dijelom uvjetuju oko 60 % maksimalne koštane mase koja se ostvari do 30. godine života. Također, žene čije su majke imale prijelom kralješka imaju veći rizik za prijelome.

Uloga prehrane u nastanku osteoporoze nije nezamjetna. Većina kontroliranih kliničkih pokusa potvrdila je da osobe koje redovno uzimaju dovoljno kalcija i vitamina D imaju 20 % do 30 % manji rizik nastanka osteoporotskog prijeloma (10). Nedostatna tjelesna aktivnost rizičan je čimbenik nastanka osteoporoze (11,12). Najočitiji primjeri su veliki gubitak koštane mase u ljudi koje borave u svemiru, te pri prolongiranoj nepokretnosti. Za koštanu masu bitna je tjelesna aktivnost u kojoj postoji opterećenje tjelesnom težinom (vježbe i aktivnosti na nogama). Navike kao što su pušenje i prekomjerna konzumacija alkohola imaju dokazan rizični utjecaj u patogenezi osteoporoze. Alkohol uzrokuje smanjeno stvaranje kosti. Pušenje ubrzava razgradnju estradiola (13). Budući da su

pušači u prosjeku mršaviji od nepušača, manja tjelesna težina i nedostatak estrogena povećavaju rizik za osteoporozu. Sekundarnu osteoporozu mogu uzrokovati prirođene bolesti skeleta (osteogenesis imperfecta, rahitis), endokrine i metaboličke bolesti (hipogonadizam, hiperparatireoidizam, hipertireoidizam), zatim malapsorpcija te kronične bubrežne i jetrene bolesti. Od lijekova najrizičnija jest dugotrajna primjena kortikosteroida, hormona štitnjače, antikonvulziva i citostatika (1).

1.1.2.2 Estrogen i kost

U normalnoj fiziologiji koštane pregradnje estrogen ima središnju ulogu te njegov manjak u menopauzi rezultira neravnotežom u koštanoj pregradnji i izrazito povećanom razgradnjom kosti. Posljedično dolazi do progresivnog gubitka trabekularne kosti, djelomično zbog pojačanog stvaranja osteoklasta. Uzrok tome najvjerojatnije je povišena razina proinflamatornih citokina koji potiču osteoklastogenezu, kao što su IL-1 (interleukin-1) i TNF-α (faktor nekroze tumora α) (14,15). Oni stimuliraju stvaranje IL-6 u osteoblastima i drugim mezenhimskim stanicama koji je vjerojatno najvažniji citokin za povećanje broja osteoklasta, što je česta značajka povećane pregradnje kosti u postmenopauzalnoj osteoporozi. Estrogen, inaktivirajući navedene citokine, sprečava pretjerano stvaranje osteoklasta. Estrogen također potiče apoptozu osteoklasta zbog povišene razine TGF-β (transformirajući faktor rasta) (16). U nedostatku estrogena količina T-stanica koje luče TNF povećava se zbog smanjene razine TGF-β. Istodobno monociti luče povećane količine IL-1, a TNF potiče stvaranje M-CSF-a (engl. macrophage colony-stimulating factor), i RANKL-a (receptor activator of nuclear factor kappa B - ligand) te djeluje na progenitore osteoklasta, što uzrokuje povećanje broja zrelih i funkcionalnih osteoklasta. Monociti periferne krvi bolesnika s osteoporozom izlučuju više IL-1, a u žena s postmenopauzalnom osteoporozom povećano stvaranje IL-1 smanjuje se liječenjem estrogenima. RANKL i IL-1 sprečavaju apoptozu osteoklasta te na taj način

produžuju njihov životni vijek. Dakle, u nedostatku estrogena broj funkcionalnih i zrelih osteoklasta se povećava. Ovaj model temelji se ponajprije na istraživanjima provedenim na ovarijektomiranim (OVX, od engl. Ovariectomy) životinjama (2).

1.1.3 KLASIFIKACIJA OSTEOPOROZE

Postoje dva glavna tipa osteoporoze: primarna osteoporoza, koja se pojavljuje spontano i sekundarna osteoporoza, koja je uzrokovana nekom bolesti i/ili lijekovima te se pojavljuje u manje od 5% slučajeva.

1. Primarna osteoporoza:

a) postmenopauzalna

b) senilna

c) idiopatska

Najveći dio starijih žena ima kombinaciju postmenopauzalne i senilne osteoporoze.

Postmenopauzalna osteoporoza (tip I osteoporoza) uzrokovana je manjkom estrogena i obično se pojavljuje u žena nakon menopauze, u dobi od 51 do 75 godina. Žene mogu izgubiti do 20% koštane mase tijekom 5 do 7 godina nakon menopauze. Tip I osteoporoza se također pojavljuje u starijih muškaraca odnosno u muškaraca s niskom razinom testosterona.

Senilna osteoporoza (tip II osteoporoza) uzrokovana je smanjenjem kalcija ili vitamina D i neravnotežom između stope razgradnje i izgradnje nove kosti. Pojavljuje se u starijih ljudi. Obično zahvaća ljude starije od 70 godina i dvaput je češća u žena nego u muškaraca.

Idiopatska osteoporoza rijedak je tip osteoporoze. Ovaj tip osteoporoze pojavljuje

se u djece i mladih odraslih ljudi koji imaju normalne razine hormona, normalne razine vitamina i razlog nastanka ove bolesti je nepoznat.

2. Sekundarna osteoporoza:

a) bolesti:

- **primarni hiperparatireoidizam i druge metaboličke bolesti kostiju**
- **hipogonadizam, amenoreja, kronične anovulacije**
- **Cushingov sindrom**
- **tireotoksikoza**
- **šećerna bolest**
- **reumatoidni artritis**
- **poremećaji gastrointestinalne i hepatobilijarne funkcije**
- **perniciozna anemija**
- **kronična opstruktivna bolest pluća**
- **osteogenesis imperfecta**
- **dugotrajno mirovanje**
- **kronična bubrežna insuficijencija**
- **transplantacija organa**
- **endometrioza, hipofosfatazija, idiopatska skolioza, limfomi i leukemije, mastocitoza, multipli mijelom, multipla skleroza, sarkoidoza, talasemija, akromegalija, Addisonova bolest, amiloidoza, ankilozantni spondilitis, kongenitalna porfirija, tumori koji secerniraju rPTH peptid, ...**

b) lijekovi:

- dugotrajno liječenje kortikosteroidima
- prekomjerna doza hormona štitnjače
- antikonvulzivi
- dugotrajna primjena antikoagulansa
- tamoksifen (premenopauzalno)
- citotoksični lijekovi (kemoterapija), imunosupresivi
- lijekovi koji dugotrajnije koče funkciju gonada
- aluminij, litij

1.1.4 DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE OSTEOPOROZE

1.1.4.1 Simptomi osteoporoze

S obzirom da se smanjenje koštane mase pojavljuje postupno, osteoporoza može dugo godina biti asimptomatska, a neki ljudi nikad ni ne dobiju simptome bolesti. Koštana gustoća može se smanjiti dovoljno do frakture kosti i to je najčešće prvi simptom bolesti. Prijelomi najčešće nastaju na kralješnici, ručnom zglobu, vratu bedrene kosti, nadlaktici i goljeničnoj kosti. Kolapsni prijelomi trupa kralješka uzrokuju klinaste deformitete i smanjenje tjelesne visine. Ovo se osobito često nalazi u sredini prsnog dijela, gdje kolaps uzrokuje torakalnu kifozu i pogoršava cervikalnu lordozu, što se opisuje kao “udovičina” grba. Pognut položaj tijela s pojačanjem zakrivljenosti kralješnice kao i gubitak visine jedan je od simptoma osteoporoze. Kosti ostalih dijelova tijela mogu puknuti, često zbog vrlo malog naprezanja ili pada. Jedna od najopasnijih ozljeda je fraktura kuka, glavni razlog smanjenja pokretljivosti i gubitka neovisnosti te nažalost i smrtnosti u starijih ljudi.

1.1.4.2 Postavljanje dijagnoze

U dijagnostici osteoporoze važni su : 1. anamneza; 2. klinički pregled; 3. rendgenogram torako-lumbalne kralješnice; 4. osnovne laboratorijske pretrage: SE, krvna slika, Ca, Ca u mokraći, P i alkalna fosfataza; 5. denzitometrija (9). Najlakši je način postavljanja dijagnoze osteoporoze, na temelju mjerenja koštane mineralne gustoće (BMD, engl. Bone Mineral Density). Mjerenjem BMD-a mlade zdrave populacije definira se prag za normalne vrijednosti. Potom se na temelju odstupanja u obliku standardnih devijacija (SD) od normalnih vrijednosti, napravi klasifikacija. To je prva učinila Svjetska zdravstvena organizacija, a Međunarodna zaklada za osteoporozu (eng. International Osteoporosis Foundation) modificirala uz primjenu testa apsorpciometrije energije dvostrukih

rentgenskih zraka DXA (engl. Dual-Energy X-ray Absorptiometry). Kada se upotrebljavaju standardne devijacije u odnosu na mladu zdravu populaciju, to se mjerenje referira kao T-score. Uredan nalaz je kada BMD ne odstupa za 1 SD od normale, što se izražava kao BMD je veći ili jednak -1 SD. Niska koštana masa ili osteopenija dijagnosticira se kad je BMD, odnosno Tscore između -1>T>-2,5 SD, a osteoporoza je prisutna kada je T-score ispod -2,5 SD. Teška osteoporoza je stanje kada je T-score ispod -2,5 SD uz postojanje jednog ili više osteoporotičnih prijeloma (9). Osim sDXA za kralješnicu i kuk, postoji i periferna pDXA kojom se mjeri gustoća kosti na podlaktici, gležnju i prstima, što pojednostavljuje postupak. Denzitometrija je zanimljiva ponajprije koliko je osjetljiva i specifična metoda za predviđanje rizika prijeloma kosti (17).

Slika 2. *Uređaj za denzitometriju DXA.*



1.1.4.3 Liječenje osteoporoze

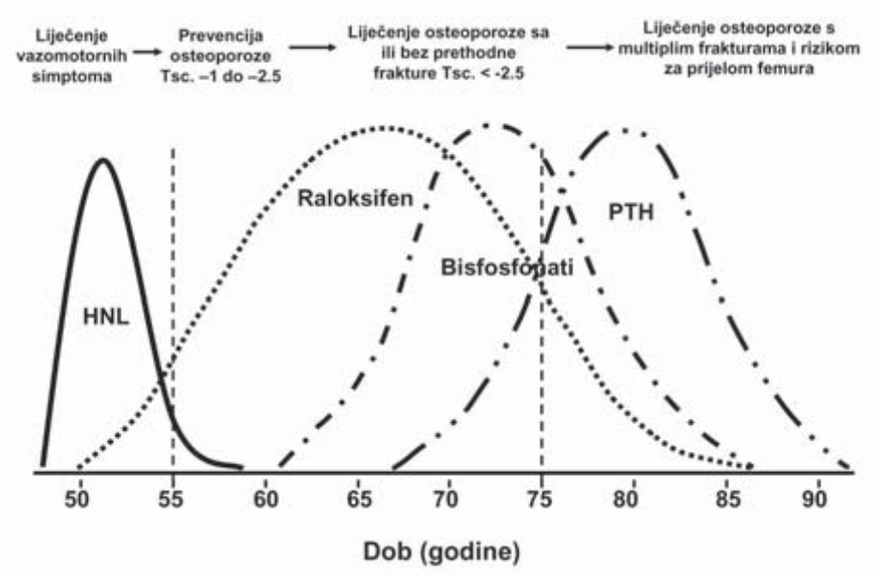
Prema smjernicama za dijagnostiku, prevenciju i liječenje osteoporoze zasnovane na dokazima, ciljevi liječenja osteoporoze su: 1) prevencija prijeloma, 2) stabilizacija i povećanje koštane mase, 3) uklanjanje simptoma prijeloma i deformiteta kosti i 4) unapređenje i očuvanje funkcionalne sposobnosti (18).

Osim općih mjera (tjelesna aktivnost, prestanak pušenja, prehrana; dovoljan unos kalcija, vitamina D i vitamina K (koji potiče sintezu osteokalcina)) lijekove za osteoporozu možemo podijeliti na slijedeće skupine: anitresorptivne lijekove te osteoanabolike. Lijekovi koji se primjenjuju u Hrvatskoj vidljivi su na tablici 2, te algoritam njihove primjene na slici 3.

Tablica 2. *Lijekovi na listi lijekova HZZO-a za liječenje osteoporoze (18).*

	Prevencija	Liječenje
Hormonsko nadomjesno liječenje (HNL)	+	+
Raloksifen (Evista)	+	+
Alendronat (Fosamax)	+	+
Risedronat (Actonel)	+	+
Calcitonin (Miacalcic)	-	+
Parathormon-PTH (Forteo)	-	+

Slika 3. *Algoritam liječenja osteoporoze (18)*.



1.1.4.3.1 *Antiresorptivni lijekovi*

Antiresorptivni lijekovi smanjuju učestalost prijeloma za otprilike 50 % do 60 %, a u njih spadaju: estrogeni, selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM-ovi), bisfosfonati i kalcitonin. U tijeku dugog razdoblja liječenja, njihovo je djelovanje na stvaranje kosti malo. Dakle, oni mogu spriječiti daljnji gubitak kosti, ali ne mogu bitno povećati koštanu masu (18).

1.1.4.3.1.1 Estrogeni

Estrogeni imaju važnu ulogu u moduliranju funkcije osteoblasta te su u oba spola primarni čimbenik održavanja zdravlja kostiju. Estrogeni zaustavljaju fazu ubrzanog gubitka kosti u ranom postmenopauzalnom razdoblju s najboljom djelotvornosti u ranoj postmenopauzi. Tada se može očekivati puna dobrobit HNL-a (hormonskog nadomjesnog liječenja), uz minimalne rizike. Prema općeprihvaćenim smjernicama HNL se danas primjenjuje rano u postmenopauzi u trajanju 3 do 5 godina, iako je poznato da se tek nakon kontinuiranog uzimanja dužeg od 15 godina povisuje rizik za rak dojke (19). Primarna indikacija za HNL je smanjenje klimakteričnih tegoba, urogenitalne atrofije i povoljan učinak na porast mineralne gustoće kosti i smanjenje rizika prijeloma za 29 % do 35 % (20). Osim ranog početka primjene HNL-a današnji principi liječenja uključuju i najnižu učinkovitu dozu koja ima gotovo iste učinke kao i standardna doza, ali uz manje nuspojava i rizika. Estrogene ne smiju dobivati žene s karcinomom dojke, endometrija ili jajnika i opstruktivnom žuticom. Također estrogene ne smiju dobivati žene koje su imale tromboembolijsku bolest, a postoji relativna kontraindikacija ako je obiteljska anamneza opterećena karcinomom dojke. Načini primjene estrogena su brojni – oralno, transdermalno, bukalno, vaginalno, potkožno i perkutano.

1.1.4.3.1.2 Selektivni modulatori estrogenskih receptora (engl. Selective estrogen response modifiers, SERM)

Glavni predstavnik ove skupine je raloksifen (raloksifen-hidroklorid), nesteroidni benzotiofen koji se veže na estrogenske receptore i inhibira koštanu razgradnju bez stimulacije endometrija i žljezdanog tkiva dojki u postmenopauzalnih žena (21,22,23). SERM-ovi interferiraju s estrogenskim receptorima i njihovim koaktivatorima i supresorima (24). Estrogenski receptor je transkripcijski čimbenik za proteine koji su pod utjecajem estrogena (25,26). Različite domene receptora različito su aktivirane u različitim tkivima, što je bit djelovanja SERM-ova, a to ima za posljedicu tkivnu specifičnost lijeka. Djelovanje na kost i lipide može se usporediti s estrogenima, međutim bez nuspojava na endometrij maternice i tkivo dojke i upitnog učinka na kardiovaskularni sustav. Prema studiji iz 2006.godine "Raloxifene Use for the Heart" (RUTH) dobar učinak raloksifena u smanjenju incidencije invazivnog karcinoma dojke i vertebralnih fraktura, treba odvagnuti u usporedbi sa njegovim djelovanjem na povećanu incidenciju venske tromboembolije i moždanog udara (27). Klinička studija STAR - "Study of Tamoxifen and Raloxifene" potvrdila je kako je raloksifen jednako djelotvoran kao tamoksifen u prevenciji karcinoma dojke (28). Raloksifen je jedini predstavnik SERM-ova na tržištu lijekova, dostupan i našim pacijentima. Indiciran je za prevenciju rizika od vertebralnih prijeloma i liječenje postmenopauzalne osteoporoze u žena koje imaju kliničke ili denzitometrijske pokazatelje osteoporoze, koje žele spriječiti i liječiti osteoporozu, s blagim ili bez menopauzalnog sindroma, koje ne žele uzimati ili žele prestati s HNL-om i koje se boje karcinoma dojke (18).

1.1.4.3.1.3 Bisfosfonati

Bisfosfonati su postali lijek prvog izbora u osteoporozi i u drugim metaboličkim bolestima kosti zbog vrlo snažnog antiresorptivnog učinka, nehormonskom djelovanju vrlo specifičnom za kost i osobito na mjestima pojačane pregradnje kosti (29). Prema kemijskoj građi bisfosfonati su analozi pirofosfata s različitim fizikalno-kemijskim osobinama. Bisfosfonati se ne metaboliziraju, a 20 % do 50 % primijenjene doze nakuplja se u kost. Bisfosfonat koji se nije vezao za kost izlučuje se bubregom i zato je potreban oprez u primjeni lijeka u bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega. Bisfosfonati djeluju na funkciju stanice putem dvaju nezavisnih mehanizama na funkciju osteoklasta (30). Bisfosfonati koji ne sadržavaju dušik (etidronat, klodronat i tiludronat) metaboliziraju se u citotoksične ATP(adenozin trifosfat)-bisfosfonatne analoge i tako modificiraju stanične funkcije (31). Djelotvorniji članovi skupine lijekova koji sadržavaju dušik: alendronat, risendronat, ibandronat i zolendrična kiselina, inhibiraju farnezil pirofosfatazu i druge distalne ciljne molekule u mevalonskom putu (32, 33,34). Rezultat toga je smanjenje lipidnog geranilgeranil difosfata, koji je potreban za aktivnost GTP-aze u citoskeletnoj organizaciji i vezikularnom putovanju u osteoklastima, što pak uzrokuje inaktivaciju osteoklasta (35). Na razini tkiva bisfosfonati smanjuju koštanu pregradnju, povećavaju koštanu masu i mineralizaciju, koja se klinički mjeri porastom mineralne gustoće kosti i povećanjem koštane čvrstoće. Posljedično, rizik prijeloma se smanjuje (35). Unatrag nekoliko godina opisuje se osteonekroza kosti, osobito čeljusti, kao nuspojava terapije bisfosfonatima. Bolesnici s multiplim mijelomom i metastatskim karcinomom koji dobivaju intravenski bisfosfonate (koji sadržavaju dušik) imaju veći rizik za osteonekrozu čeljusti i oni predstavljaju 94 % objavljenih slučajeva (36,37). Bisfosfonati su indicirani za sprječavanje i liječenje osteoporoze muškaraca i žena, i to onih koji imaju nizak BMD kralješnice i kuka, kad je potrebno čim prije povećati mineralnu gustoću i jače suprimirati pregradnju kosti, u bolesnika s teškom osteoporozom s prijelomima i povećanim rizikom za prijelom kuka, te u bolesnika sa sekundarnom osteoporozom (18).

1.1.4.3.1.4 Kalcitonin

Kalcitonin je polipeptid koji stvaraju C-stanice štitnjače, smanjuje serumske koncentracije kalcija i inhibira aktivnost osteoklasta (38). Kalcitonin se veže za receptore na osteoklastima, nakon čega se izravna njihova nazubljena površina, a koštana razgradnja prestaje (39). Najširu primjenu ima kalcitonin proizveden od lososa, jer djeluje snažnije i duže nego kalcitonin čovjeka. U liječenju osteoporoze upotrebljava se u obliku intramuskularnih injekcija, a zadnjih desetak godina dostupan je i u obliku nazalnog spreja (38). Dugogodišnja primjena nazalnog spreja može pobuditi lokalnu reakciju – ulceracije nosne sluznice, te epistaksu. Pri parenteralnoj primjeni kalcitonina u otprilike 10 % bolesnika mogu se pojaviti nuspojave – crvenilo lica, mučnina i povraćanje. Sistemske, ozbiljne alergijske reakcije pri primjeni kalcitonina moguće su, ali vrlo rijetke. Kalcitonin održava ili povećava BMD aksijalnog skeleta i smanjuje rizik nastanka vertebralnih prijeloma (40,41), međutim nije snažan antiresorptivni agens pa njegova primjena nije prikladna za žene u ranoj postmenopauzi. Preporučuje se ženama s osteoporozom koje su u postmenopauzi duže od 5 godina. U otprilike 50 % bolesnika liječenih duže od 6 mjeseci mogu se naći cirkulirajuća protutijela koja katkad mogu neutralizirati djelovanje kalcitonina. Kalcitonin ima također analgetski učinak, vjerojatno zbog vezanja na specifična mjesta u mozgu i modifikacije descedentnog serotoninergičnog puta na osjetnom putu (42).

1.1.4.3.1.5 Flavonidi

Glavni predstavnik flavonida je ipriflavon, oralno aktivna tvar koja inhibira koštanu resorpciju. Kliničke i eksperimentalne studije pokazuju da je djelotvornost flavonida vrlo mala (43). Od nuspojava primijećen je snižen broj limfocita, odnosno limfopenija u 13,2 % žena (44).

1.1.4.3.2 *Osteoanabolici*

Osteoanabolici izravno ili neizravno potiču osteoblaste na stvaranje kosti. Tu spadaju paratiroidni hormon, fluorid i stroncijev relat.

1.1.4.3.2.1 Paratiroidni hormon (PTH)

Paratiroidni hormon (PTH), kad se primjenjuje intermitentno u malim dozama, ima anabolički učinak na kost posredovan stvaranjem peptidnih koštanih čimbenika rasta kao što je inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. insulin like growth factor, IGF) i TGF-β (45,46). Kad se PTH primjenjuje kontinuirano u velikim dozama, dolazi do povećane koštane pregradnje i gubitka koštane mase. Učinak se ponajprije očituje na trabekularnoj kosti aksijalnog skeleta. Pretklinička istraživanja pokazala su da PTH može inducirati stvaranje osteosarkoma u štakora nakon 18 mjeseci primjene, što nije potvrđeno u ljudi (47). Primjena 1-34 PTH (teriparatida) posebno je prikladna za slučajeve uznapredovale osteoporoze u starijih ljudi sa smanjenom osteoblastogenezom. Primjena 1-34 PTH-a ograničena je načinom primjene – danas su dostupne samo potkožne injekcije, ali se istražuju i drugi načini primjene (transdermalni).

1.1.4.3.2.2 Fluorid

Liječenje fluoridima povećava stvaranje kosti izravnim djelovanjem na koštane stanice, gdje inhibiraju aktivnost osteoblastične kisele fosfataze koja je odgovorna za defosforilaciju tirozin kinaze (48,49). Taj učinak pojača djelovanje tirozin-kinaze i time pojača odgovor na djelovanja čimbenika rasta koji uzrokuju diobu koštanih stanica.

Učinak se očituje više na trabekularnoj kosti kralješnice nego na kortikalnoj kosti. Liječenje fluoridima ima znatne nuspojave, poput povećane koštane fragilnosti jer nova kost ima abnormalnu strukturu. Fluorid se naime inkorporira u mineralnu fazu kosti te je kost spužvasta, nepravilna i nedovoljno mineralizirana.

1.1.4.3.2.3 Stroncijev ranelat

Stroncijev ranelat djeluje na koštanu pregradnju dvostruko: povećava količinu novostvorene kosti putem stimulacije diobe nezrelih osteoblasta i usporava koštanu resorpciju inhibirajući diferencijaciju i aktivnost osteoklasta (50,51). Na različitim životinjskim modelima, stroncijev ranelat povećava masu trabekularne kosti, broj i debljinu trabekula, odnosno povećava čvrstoću kosti (50,51,52). Stroncij se veže na površinu kristala apatita, a samo manjim dijelom zamjenjuje atome kalcija u kristalima minerala novostvorene kosti. Pri tome bitno ne mijenja strukturna svojstva minerala (53). Stroncijev ranelat dobro se podnosi – najčešće su gastrointestinalne nuspojave (mučnina i proljev) koje se pojavljuju na početku liječenja. Stroncijev ranelat uzrokuje klinički neznačajne promjene koncentracije kalcija i fosfora u krvi. Međutim, prema najnovijim spoznajama Europske agencije za lijekove (engl.European Medicines Agency, EMA) postoji ozbiljan rizik od kardiovaskularnih bolesti uključujući infarkt miokarda. Analiza radomizirane kliničke studije pokazala je da taj rizik u odnosu na placebo skupinu iznosi 1.6 [95% CI 1.07–2.38]). Najnovije smjernice za lijek, do konačne odluke EMA-e, uključuju žene u postmenopauzi, kao i muškarce s teškim oblikom osteoporoze i visokim rizikom za prijelome, s posebnim oprezom za pacijente s visokom stopom rizika od kardiovaskularnih bolesti (nekontrolirana hipertenzija, diabetes mellitus, perfiferna arterijska bolest, cerebrovaskularna bolest, pušenje).

1.1.4.3.3 *Potencijalni lijekovi*

1.1.4.3.3.1 Peptidni čimbenici rasta

Peptidni čimbenici rasta reguliraju koštani metabolizam čime spadaju u red potencijalnih lijekova za poticanje koštanog rasta. Problemi vezani uz primjenu peptidnih čimbenika rasta u liječenju osteoporoze su brojni, a najveći od njih jest način primjene. Peptidni se čimbenici rasta moraju primjenjivati parenteralno, što je najveća prepreka njihovoj uporabi u bolesnika s kroničnim bolestima. Koštani morfogenetski protein (eng. Bone morphogenetic protein, BMP-6) peptidni je čimbenik rasta kod kojeg je pokazana djelotvornost oralne primjene. Sistemna primjena peptidnih čimbenika uzrokuje jake nuspojave ili npr. fibrozu zbog proliferacije mezenhimalnih stanica uz primjenu TGF-β. Njihova korist je dakle moguća samo u lokalnoj primjeni. BMP-6 ima specifičan učinak na kost, bez sistemskih nuspojava. Mogućnost oralne primjene i netoksičnost važan je preduvjet za primjenu BMP-6 u liječenju osteoporoze (18).

1.1.4.3.3.2 Inhibitori proteasoma

Ispitujući mehanizme pomoću kojih se reguliraju čimbenici rasta i transkripcijski čimbenici koji kontroliraju stvaranje kosti, pronađeno je kako ubikvitin-proteasomski put djeluje na izražaj BMP-2 i stvaranje kosti. Proteasomski inhibitori pojačavaju izražaj BMP-2 i BMP-4 u osteoblastima te bi mogli imati značenje u liječenju bolesti s gubitkom koštane mase (54).

1.1.4.3.3.3 Leptin

Leptin je hormon kojeg izlučuju adipociti, a važan je za homeostazu energije u organizmu. Adipociti i osteoblasti potječu iz zajedničke stromalne stanice. Inhibicija izlučivanja leptina pojačava koštanu masu (55). U bolesnika s osteoporozom prekomjerna težina djeluje zaštitno na koštanu masu, vjerovatno zbog neosjetljivosti na leptin (56,57). Antagonisti leptina mogli bi imati ulogu stimulatora povećanja koštane mase.

1.1.5 ŽIVOTINJSKI MODEL OSTEOPOROZE

Eksperimentalni životinjski modeli za istraživanje osteoporoze omogućili su razumijevanje mehanizama nastanka osteoporoze i primjenu liječenja u ljudi. Najčešće upotrebljavan jest osteoporotični model štakora - model ovarijektomije. Ovarijektomijom uklanjamo estrogene te se štakorima posljedično smanjuje količina trabekularne kosti, zatim povećava broj osteoklasta, osteoblasta, površina kosti pokrivena osteoklastima i osteoblastima, odnosno koštanu pregradnja, dok je zamjena kosti ubrzana. Epifizna ploča rasta stanjena je uz smanjen omjer između mineralizirane i nemineralizirane kosti, dok je smanjenje gustoće i volumena kosti te ubrzanje koštanog metabolizma izraženije u metafizama dugih kostiju nego u kralješcima. Longitudinalni rast dugih kostiju je ubrzan. Ovarijektomija također uzrokuje stanjenje kortikalne kosti uz smanjenu gustoću. Američka uprava za hranu i lijekove (FDA - Food and Drug Administration) izdala je smjernice za upotrebu životinjskih modela osteoporoze u svrhu pretkliničkog ispitivanja lijekova (58).

1.1.6 KRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA I KOST

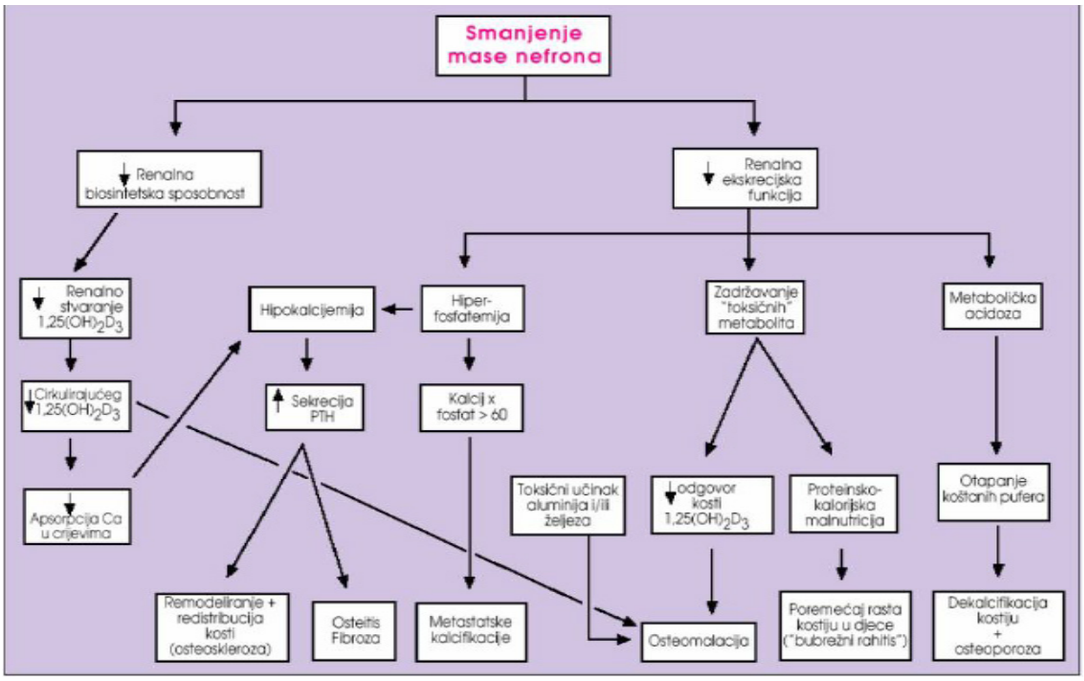
Kronična bubrežna bolest je oštećenje bubrega ili smanjenje bubrežne funkcije, tj. glomerularne filtracije na manje od 60 ml/min/1.73 m^2 duže od tri mjeseca. Glavni kriterij za određivanje stadija kronične bubrežne bolesti je veličina odnosno smanjenje glomerularne filtracije. Razlikujemo pet stadija:I stadij - bolesnici s glomerularnom filtracijom (GF) > 90 ml/min/1.73m^2, ali s oštećenjem bubrega (npr. proteinurijom), II stadij - bolesnici s GF 60-89 ml/min/1.73m^2, III stadij - bolesnici s GF 30-59 ml/min/1.73m^2, IV stadij - bolesnici s GF 15-29 ml/min/1.73m^2, V stadij - bolesnici s GF manjom od 15 ml/min/1.73m^2 ili su već na dijalizi (engl.ERSD-end stage renal disease). Kronična bubrežna bolest jako je raširena u svijetu s rastućom prevalencijom te posljedično dovodi do gubitka bubrežne funkcije, kardiovaskularnih komplikacija te prerane smrti (59). U terminalnom bubrežnom zatajenju tj. uremiji dolazi do kliničkog poremećaja na brojnom organskim sustavima, a prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. *Poremećaji na organskim sustavima u kroničnom bubrežnom zatajenju.*

ORGANSKI SUSTAV	POREMEĆAJ
Kardiopulmonalni	hipertenzija, zatajenje srca, perikarditis, aritmija, ubrzana ateroskleroza, uremična pluća
Hematološki	anemija, hemoragična dijateza, limfocitopenija
Imunološki	disfunkcija leukocita, poremećaji celularne imunosti, povećana sklonost infekcijama i malignim bolestima
Gastroenterološki	povraćanje,gubitak tjelesne težine,gastroduodenalni ulkus, gastrointestinalna krvarenja, hepatitis
Acidobazni i elektrolitski	metabolička acidoza, poremećena homeostaza kalija, natrija
Endokrino-metabolički	renalna osteodistrofija, kalcij i fosfor-sekundarni hiperparatireoidizam, sterilitet, gubitak libida, smanjena tolerancija glukoze, hipertrigliceridemija, hiperuricemija
Neuromuskularni	grčevi muskulature, periferna neuropatija, tremor, hipertenzivna encefalopatija, koma
Koža	svrbež, ekskorijacije, modrice

Poremećaji u metabolizmu minerala i bolesti kostiju (renalna osteodistrofija) česte su komplikacije kroničnog bubrežnog zatajenja te važan čimbenik smrtnosti i smanjene kvalitete života (Slika 4).

Slika 4. *Algoritam komplikacija u kroničnom bubrežnom zatajenju.*

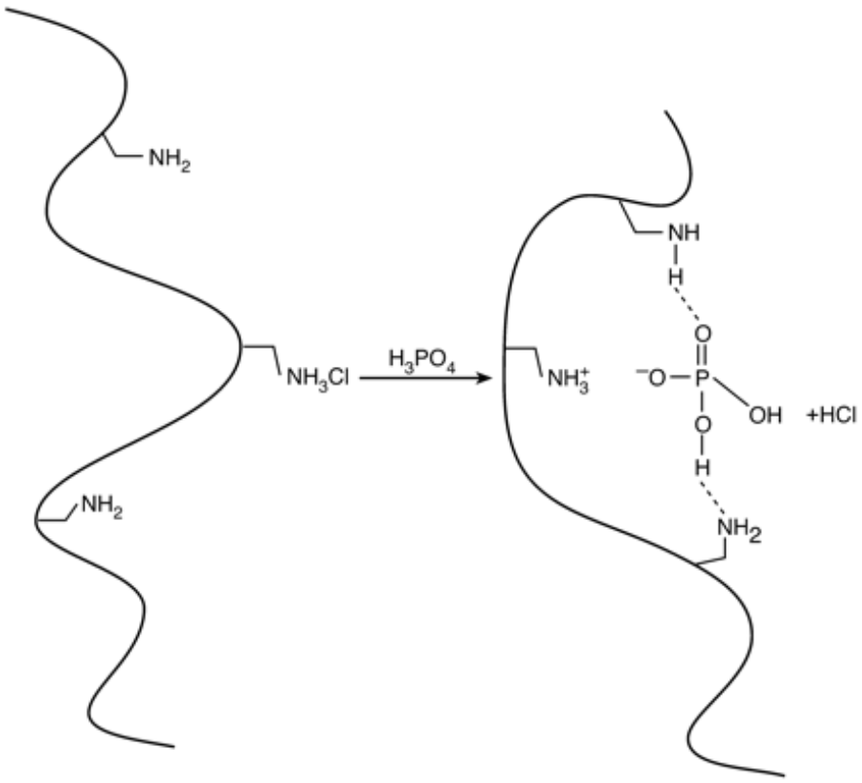


Dokazano je da su navedeni poremećaji metabolizma minerala i kosti povezani s visokim rizikom kardiovaskularne kalcifikacije koja je glavni uzrok smrtnosti bolesnika na dijalizi (60,61). U pacijenata na hemodijalizi hiperfosfatemija je značajan prognostički faktor kardiovaskularne smrtnosti, te je povezana s povišenim kalcij-fosfatnim (Ca x P) produktom, hiperparatiroidizmom, paratiroidnom hiperplazijom te rezistencijom na vitamin D. To sve skupa rezultira osteodistrofijom, disfunkcijom i kalcifikacijom krvožilnog sustava (62). Lijekovi koji se preporučuju u kontroli hiperfosfatemije i prevenciji sekundarnog hiperparatiroidizma fosfatni su vezači koji sadrže kalcij te aktivni oblici vitamina D (63). Međutim, „Treat to Goal“ klinička studija pokazala je da učestala upotreba fosfatnih vezača koji sadrže kalcij, ne sprečava, nego i pridonosi kalcifikaciji mekih tkiva (64). S druge strane, sevelamer-HCl djeluje preventivno na arterijsku kalcifikaciju u kroničnih bubrežnih bolesnika. Štoviše, u kombinaciji s novim sterolima aktivnog vitamina D (npr. doksekalciferol) sevelamer povećava sigurnost liječenja sekundarnog hiperparatiroidizma (64).

1.2 *SEVELAMER HIDROKLORID (RENAGEL®)*

Sevelamer hidroklorid je po svom kemijskom sastavu polimer alilamin-hidroklorida povezan s epiklorohidrinom u kojem je 40% amina protonirano. Kemijska struktura jest: poli (alilamine-co-N,N'-dialil- 1,3-diamino-2-hidroksipropan) hidroklorid (Slika 5). Sevelamer hidroklorid je hidrofilan, ali netopljiv u vodi.

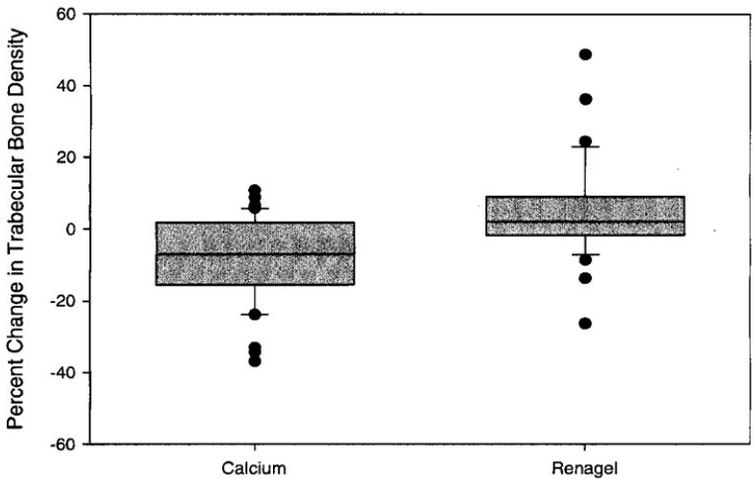
Slika 5. *Kemijska struktura sevelamer hidroklorida.*



Sevelamer hidroklorid (Renagel®, Genzyme) je fosfatni vezač koji, za razliku od ostalih fosfatnih vezača, ne sadrži soli kalcija, magnezija niti aluminijski hidrogel. Sevelamer se ne apsorbira u probavnoj cijevi niti se razgrađuje u crijevima. Mehanizam djelovanja jest da sevelamer preko svojih amino skupina prima protone i veže fosfate preko vodikovih veza. Sevelamer-HCl učinkovito smanjuje crijevnu apsorpciju fosfata,

smanjujući tako koncetraciju fosfata u serumu, zatim smanjuje koncetraciju Ca x P produkta te sekreciju PTH-a (65). U randomiziranoj "Treat to Goal" studiji, pacijenti na dijalizi dobivali su fosfatne vezače koji sadrže kalcij, odnosno sevelamer, fosfatni vezač koji ne sadrži kalcij. Razina serumskih fosfata i PTH u tih pacijenata bila je pod strogom kontrolom. U pacijenata koji su primali fosfatne vezače što sadrže kalcij, rezultati studije pokazali su da je, unatoč jednakoj koncetraciji Ca x P produkta u serumu, viđena progresija kalcifikacije koronarnih arterija i aorte. Za razliku od njih, pacijenti koji su primali sevelamer, imali su statistički značajno smanjenu progresiju vaskularne kalcifikacije (64-67). Ovi rezultati potvrđuju da sevelamer može spriječiti progresiju kalcifikacije, ali mehanizam nije još istražen. Kako je zadnja faza bubrežnog zatajenja povezana s visokom smrtnošću, ponajprije zbog povišenog rizika od kardiovaskularne bolesti, sevelamer smanjujući kalcifikaciju aorte i koronarnih arterija djeluje povoljno na preživljenje pacijenata na hemodijalizi (61,65). Pacijenti liječeni sevelamerom također su imali manju hiperkalcemiju, smanjenu sekreciju paratiroidnog hormona, smanjenu razinu C-reaktivnog proteina u serumu, smanjen ukupni i LDL kolesterol, te povećanu razinu HDL kolesterola (64,67). Sevelamer također povećava gustoću trabekularne kosti u pacijenata s kroničnom bubrežnom insuficijencijom (65). Nadalje, dokazano je da sevelamer-HCl značajno povećava serumsku razinu osteokalcina i koštanu specifičnu alkalnu fosfatazu i BMD u pacijenata u terminalnoj fazi kroničnog bubrežnog zatajenja u usporedbi s fosfatnim vezačima koji sadrže kalcij (acetatne i karbonatne soli) (Slika 6) (68). Anorganski dio kosti sastoji se od kalcijeva fosfata, a fosfor je jednako kao kalcij važan u održavanju kosti (66). Mnogi lijekovi za osteoporozu poput sevelamera izravno utječu na homeostazu kalcija i fosfata, poput PTH, bisfosfonata, vitamina D i FGF-23. U ovome radu istražili smo mogućnost djelovanja sevelamer-HCl-a na koštanu mineralnu gustoću, mikroarhitekturu te jakost kostiju, odnosno njegovu učinkovitost u liječenju osteoporoze u osteoporotičnom modelu ovarijektomiranih štakora.

Slika 6. *Usporedba djelovanja kalcija i sevelamera na trabekularnu koštanu mineralnu gustoću (BMD) u tijeku 2 godine liječenja (68).*



2 HIPOTEZA

Sevelamer-HCl u štakorskom modelu osteoporoze povećava koštanu mineralnu gustoću, poboljšava koštanu mikroarhitekturu i biomehanička svojstva kosti.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati utječe li sevelamer-HCL primjenjivan *ad labium* na koštanu mineralnu gustoću ovarijektomiranih štakora u životinjskom modelu osteoporoze mjerenjem tibije, femura i kralješnice metodom denzitometrije (DXA) *in vivo* u različitim intervalima pokusa (svaka 4 tjedna) te *ex vivo* na kraju pokusa.

2. Ispitati učinak doze i intervala primjene sevelamer-HCl-a na kost.

3. Ispitati utjecaj sevelamer-HCl-a na koštanu mikroarhitekturu (trabekularnu i kortikalnu kost) primjenom metoda microCT-a, pQCT-a te koštanom histomorfometrijom *ex vivo* na kraju pokusa.

4. Ispitati utjecaj sevelamer-HCL-a na serumske biokemijske parametre: Ca, P, Mg te biljege koštane pregradnje: C-telopeptid, osteokalcin te profil citokina u serumu dobivenom prilikom žrtvovanja štakora na kraju pokusa.

5. Ispitati biomehanička svojstva kostiju u štakora tretiranih sevelamer HCl-om biomehaničkim testovima: 3 point bending i indentation testom na *ex vivo* dobivenim štakorskim femurima.

6. Dokazati mehanizam djelovanja sevelamer-HCl-a proteomskom analizom *ex vivo* dobivenog seruma tretiranih životinja u usporedbi s kontrolom, primjenom 2D gelova i masene spektrofotometrije.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 *POKUSNE ŽIVOTINJE I PROTOKOL*

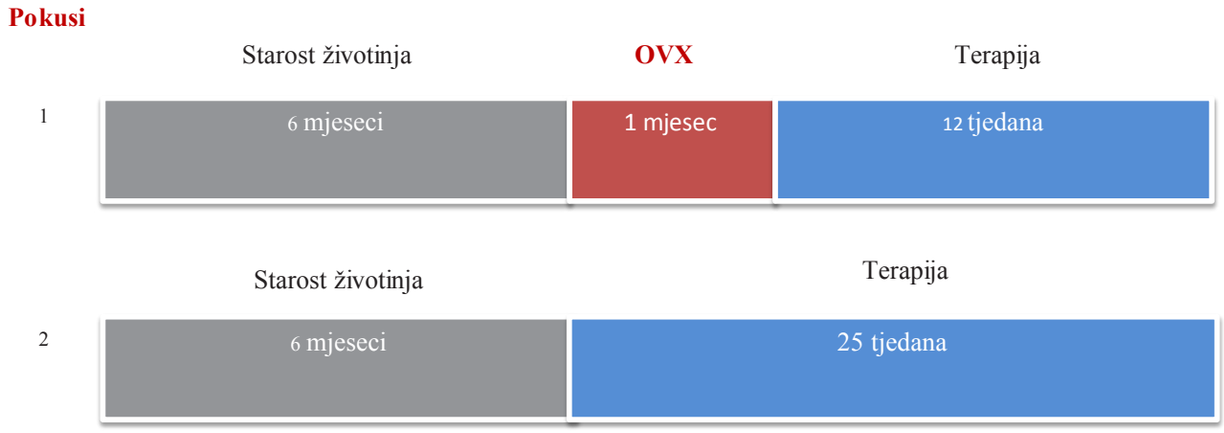
Ukupno 120 ženki štakora soja Sprague-Dawley u dobi od šest mjeseci, iz uzgoja tvrtke "Harlan Winkelmann", Borchen, Republika Njemačka upotrebljeno je u istraživanju. Životinje su bile teške oko 300 g. U svakom kavezu bile su smještene dvije životinje, sa slobodnim pristupom vodi i standardnoj hrani za glodavce "Mucedola" 4RF21 (Mucedola, Italija).

Ženkama starim 7 mjeseca uklonjeni su jajnici sterilnim instrumentima pod anestezijom rompunom (Xylapan 0.6 ml/kg i.p.) i ketaminom (Narketan 0.8 ml/kg i.p.). Operacija je izvršena abdominalnim putem, središnjim rezom uz odvajanje kože od potkožja. Skupina SHAM predstavlja lažno operirane životinje, odnosno učinjen je kožni i potkožni rez, a zatim je životinja, bez uklanjanja jajnika zašivena. Skupina s oznakom OVX sadržava životinje kojima je učinjena ovarijektomija s podvezivanjem jajovoda. Tijekom narkoze i nekoliko sati nakon buđenja životinje su se držale na toplom. U postoperativnom periodu za tretman boli koristio se Carprofen (Rimadyl) u dozi 5 mg/kg, sc.

Terapija sevelamer-HCl-om davana je u dva slijedeća eksperimentalna modela; 1. U pokusu 1 terapija je započela mjesec dana nakon ovarijektomije i trajala 12 tjedana u sljedećim skupinama: (1) Sham (n=15); (2) OVX (n=15); (3) OVX + sevelamer 3% (n=15); 2. U pokusu 2, skupine: 1) Sham (n=10); (2) Sham + sevelamer 3% (n=10) tretirane su sevelamerom 25 tjedana. (Slika 7). U skupini 2, pokus je produžen na 25 tjedana jer nakon 12 tjedana nije bilo statistički značajne razlike izmneđu sham štakora koji su dobivali svelamer i sham kontrola. Sevelamer se životinjama davao *ad labium*, pomiješan sa standardnom prehranom za glodavce "Mucedola" 4RF21 (Mucedola,

Italy) u koncetracijama od 3%. Kontrolne životinje su dobivale standardnu prehranu "Mucedola" 4RF21 bez dodataka sevelamera. Svi su pokusi odobreni od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Slika 7. *Shematski prikaz pokusnih protokola; Pokus 1: terapija sevelamerom 12 tjedana, mjesec dana nakon OVX; Pokus 2: terapija sevelamerom SHAM životinja 25 tjedana bez OVX.*

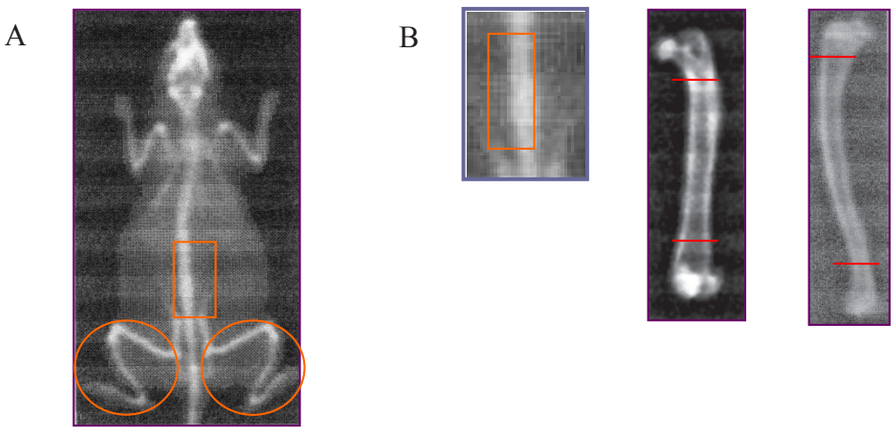


4.2 *In vivo i ex vivo mjerenje koštane mineralne gustoće (BMD) metodom denzitometrije (DXA)*

Svaka 4 tjedna mjerila se mineralna gustoća stražnjih udova i lumbalne kralježnice štakora denzitometrom s programom za male laboratorijske životinje (DXA; Hologic QDR-4000, Hologic, Waltham, MA) (69). Životinje su prethodno uspavane rompunom (Xylapan 0.6 ml/kg i.p.) i ketaminom (Narketan 0.8 ml/kg i.p.). Životinje su bile smještene na posebnu podlogu, te učvršćene ljepljivim trakama kako bi ostale u željenom položaju tijekom mjerenja mineralne gustoće kosti. Nulto mjerenje mineralne gustoće kosti učinjeno je prije početka pokusa. Na kraju pokusa životinje su izvagane te žrtvovane u anesteziji: Rompun 5mg/kg i.m.+Ketamin 35mg/kg i.m. + T61 0.3 ml/kg intrapulmonalno. Femur, tibija i lumbalna kralježnica su fiksirane u 70%-tnom etanolu te iskorištene za *ex vivo*

određivanje koštane mineralne gustoće ("bone mineral density"-BMD) uporabom DXA uređaja opremljenog s Regional High Resolution Scan softverom (70). Na dobivenim slikama analizirala se koštana mineralna gustoća cijele kosti te proksimalne i distalne metafize tibije i femura, kao i BMD lumbalne kralješnice. Polje skeniranje je bilo 5.08 x 1.902 cm, rezolucija 0.0254 x 0.0127 cm te brzina od 7.25 mm/sek (Slika 8).

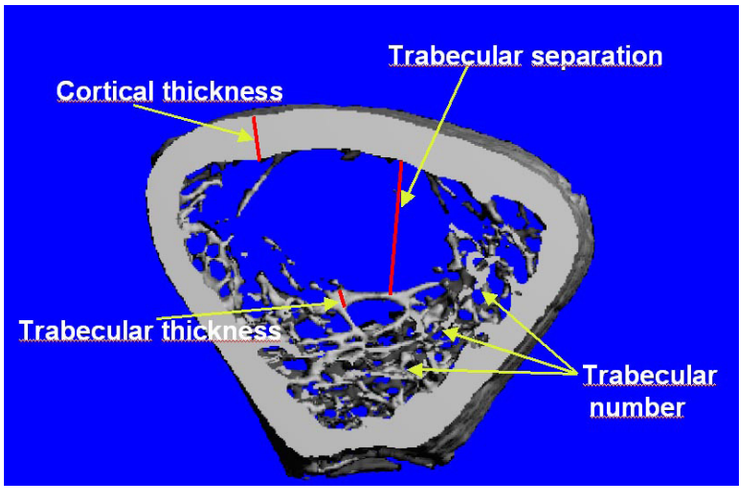
Slika 8. *Mjerenje koštane mineralne gustoće (BMD) metodom denzitometrije (DXA); A) In vivo BMD cijelog tijela te segmentalna analiza slabinske kralješnice i stražnjih ekstremiteta, B) Ex vivo analiza BMD slabinske kralješnice, femura i tibije sa segmentalnom analizom proksimalne i distalne metafize.*



4.3 *PQCT – Periferna kvantitativna kompjutorska tomografija i MicroCT- Mikrokompjuterizirana tomografija*

Po završetku pokusa, perifernom kvantitativnom kompjutorskom tomografijom s verzijom softvera 5.40 (Stratec XCT Research M; Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, USA) (71,72) analizirana je mineralna gustoća ukupne koštane površine te trabekularne i kortikalne regije prethodno izdvojenih femura. Primjenom uređaja za mikrokompjuteriziranu tomografiju (μCT 40) i odgovarajućeg softvera (SCANCO Medical AG, Bassersdorf, Switzerland) analizirana je trabekularna građa femura i petoga lumbalnog kralješka (73). MicroCT je uređaj koji omogućuje precizno skeniranje kosti te trodimenzionalnu rekonstrukciju slike s pomoću triangulacijskog algoritma. Distalni femur i peti lumbalni kralješak skeniran je u 250 prereza, svaki debljine 13 μm u dorzoventralnom smjeru (74). Primjenom metode koju su opisali Hildebrand i sur., analizom 3D slika uređaj određuje sljedeće parametre: volumen trabekularne kosti (BV, mm^3), broj trabekula (Tb. N., 1/mm), trabekularnu debljinu (Tb. Th., μm) i razdvojenost trabekula kosti (Tb. Sp., μm) (75). Faktor stvaranja trabekularne kosti (Trabecular bone pattern factor -TBPf) i strukturalni indeks (structure model index -SMI) izračunavaju se primjenom kompjutorskog programa koji je sastavni dio microCT uređaja (Slika 9) (76).

Slika 9. *Shematski prikaz parametara mjerenih microCT metodom. Debljina kortikalne kosti -engl. Cortical thickness; razdvojenost trabekula- engl. Trabecular separation; debljina trabekula- engl. Trabecular thickness; broj trabekula-engl. Trabecular number.*



4.4 *Histologija i histomorfometrija*

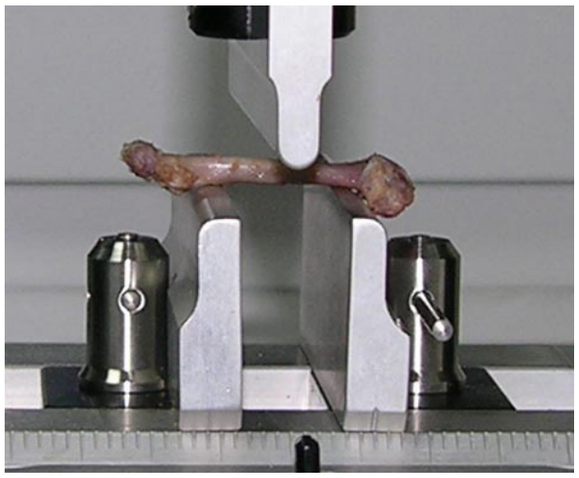
14. i 4. dan prije žrtvovanja životinje su subkutano primile injekciju fluorokrom kalceina u dozi od 10 mg/kg (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Femuri izdvojeni nakon žrtvovanja histomorfometrijski su analizirani kompjuterskom analizom slika (Bioquant II, R and M Biometrics, Nashville, TN) (77, 78,79). Statistička analiza učinjena je pomoću StatView 4.0 paketa (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Za histološku analizu prethodno dekalcinirani femuri uklopljeni su u parafin, odrezani na 7-μm debele rezove, te obojeni hemalaun-eozinom i toluidinskim plavilom kako bi se utvrdili potencijalni terapijski učinci.

4.5 *Biomehaničko testiranje*

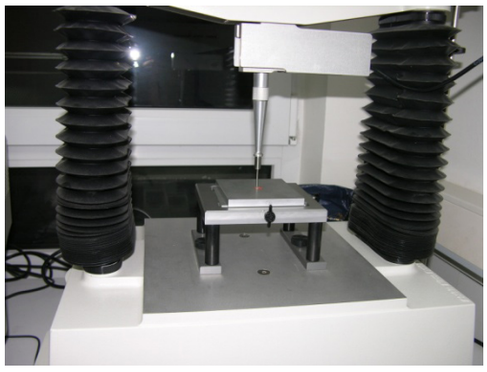
Na kraju pokusa na kosti femura učinjena su dva tipa mehaničkog testiranja pomoću sustava za testiranje materijala (TA.HDplus Texture Analyzer; Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). „3 point bending“ test korišten je za utvrđivanje mehaničkih

svojstava kortikalne kosti femura. Dijafiza femura testirana je pod opterećenjem od 30 kg i brzinom 0.1 mm/sek do frakture, metodom Turner i Burr (80) (TA.HD plus Load Cell30kg; Stable MicroSystems). Maksimalna snaga i čvrstoća dobiveni su izračunom iz krivulje opterećenja. Test indentacije korišten je da bi se utvrdila mehanička svojstva spužvaste kosti u koštanoj šupljini distalne femoralne metafize (81,82) (Slika 10).

Slika 10. *A. „3 point bending“ test korišten je za utvrđivanje mehaničkih svojstava kortikalne kosti femura. B. Fraktura dijafize štakorskog femura nakon „3 point bending“ testa. C. Test indentacije korišten je da bi se utvrdila mehanička svojstva trabekularne kosti u koštanoj šupljini distalne femoralne metafize.*

A 

B 

C 

4.6 *Stanična kultura*

Stanice koštane srži dobivene iz femura i tibije štakora nakon 4 tjedna tretmana sa sevelamerom nasađene su u broju 24 x 106 po jažici na ploči s 24 jažice u α-MEM staničnom mediju (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD; sadži 10% serum goveđeg fetusa (FCS). Pola volumena staničnog medija promijenjeno je nakon 3.dana. Medij za diferencijaciju osteoblasta koji sadrži α-MEM, 10% FCS, 8 mm ß-glicerofosfat, 50 µg/ml askorbinske kiseline i 10^{-8}M deksametazona dodan je 7. dan pokusa, te se mijenjao svaka 2 dana do završetka stanične kulture. 14. dan jednostanične su suspenzije isprane dvaput sa PBS-om i ponovo nasađene u 1x pufer za vezanje [0.01m HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mm NaCl, i 2.5 mM $CaCl_2$] u koncetraciji od 1x 10^6 stanica/mL. Stanice su alikvotirane (100 µl) u polipropilenskim cijevima i inkubirane s aneksin V fluorescein izotiocijanatom (5 ml) te sa 50 µg/ml staničnom kulturom od 14. dana, stanice iz tri jažice iz svake grupe analizirane su protočnom citometrijom. Za fluorescencijski-aktiviranu analizu staničnih vrsta, stanice su obojane s aneksin V/propidijum jodidom (10 ml) 15 min na 4 C u mraku. Analiza protočne citometrije učinjena je na FACS Caliburusing CELLQuest softweru (BectonDickinson,MountainView,CA), analizirajući 5–10x10^4 stanica po uzorku. Stanice iz preostalih jažica fiksirane su 4% paraformaldehidom, te su adherentne stanice progenitora osteoblasta identificirane bojanjem alkalnom fosfatazom (stanična vijabilnost, bojanje na alkalnu fosfatazu-pozitivno) pomoću komercijalnog kita (86-R ALP kit za bojanje; Sigma Chemical) (83,84). Medij za diferencijaciju osteoklasta sadržavao je α-MEM, 10% FCS, stimulirajući faktor rekombinantne mišje kolonije makrofaga - (CSF) (50ng/ml;SigmaChemical), i rekombinantni ljudski topljivi receptor aktivator nuklearnog faktora -κB ligand (RANKL) (50 ng/ml; Sigma Chemical). Stanični medij i faktori dodani su 1.dan i mijenjani svaki drugi dan do završetka pokusa 6.dana. Stanice iz 3 jažice po svakoj grupi analizirane su protočnom citometrijom kao što je opisano u analizi osteoblasta. Ostatak stanica iz jažica fiksiran je sa 4% paraformaldehidom te su adherentni osteoklasti identificirani pomoću tartrat-rezistentne kisele fosfataze (TRAP)

pomoću bojanja komercijalno dostupnim kitom (Sigma Chemical). Podaci prezentirani odgovaraju trima neovisnim pokusima sa tri duplikata jažica u svakom pokusu

4.7 *Biokemijski parametri u serumu*

Serumski markeri koštane izgradnje i razgradnje izmjereni su komercijalno dostupnim kitovima iz seruma dobivenim prilikom žrtvovanja na kraju pokusa. Serumska koncentracija osteokalcina izmjerena je metodom ELISA pomoću štakorskog osteokalcin EIA kita (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA). Serumska koncentracija C telopeptida (CTx) mjerena je metodom ELISA pomoću RatLaps ELISA kitova (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Denmark). Profil citokina u serumu analiziran je pomoću Rat Cytokine 24-Plex prethodno pripremljenim kitom (Millipore Corp., Billerica, MA). Analizirani citokini uključivali su: eozin, granulocitno-makrofagni-CSF, granulocitni-CSF, IL-1a, monocitni kemotaksijski protein-1, makrofagni upalni protein 1a, IL-4, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-9, IL-13, IL-10, IL12p70, IL-5, interferon g, IL-17, IL-18, inducirajući protein-10, onkogen reguliran rastom KC, RANTE, TNF-α, i vaskularni endotelni faktor rasta. Za svaki uzorak, pripremljeni su duplikati jažica u odgovarajućoj koncentraciji. Vrijednost intenziteta fluoresceina iz svakog uzorka izračunata je pomoću standardnih krivulja da bi se utvrdila koncentracija citokina. Serumske vrijednosti PTH i FGF-23 mjerene su pomoću Rat intact PTH ELISA kitova (Immutopics, San Clemente, CA) i FGF-23 ELISA kitom (KainosLaboratories,Tokyo,Japan).

4.8 *Proteomika*

Profiliranje seruma metodom „Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF)“.

SELDI-TOF masena spektrofotometrija (MS) (85) korištena je za identifikaciju proteina u serumu da bi se usporedile razlike između OVX štakora te OVX štakora tretiranih sevelamerom. Da bi se smanjila kompleksnost uzoraka i povećala rezolucija detektiranja, uzorci seruma su frakcionirani prije stavljanja na chipove. Frakcioniranje seruma učinjenio je pomoću kromatografije sa snažnom promjenom aniona (engl. strong anion exchange chromatography) pomoću filtracijske ploče za proteinske čipove (engl. "ProteinChip Q Filtration Plate") iz serumskog kita za frakcioniranje (engl. Serum Fractionation Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)) prema odgovarajućim uputama proizvođača. Tri različita proteinska čipa korištena su za profiliranje proteina frakcioniranih serumskih uzoraka: CM10 (slabi kationski izmjenjivač), IMAC30 (metal vežući proteini) i H50 (hidrofobno vezanje). Odgovarajući puferi za vezanje bili su slijedeći: CM10 pufer [0.1M natrij acetat (pH4.0)]; IMAC30 pufer [površina molekule nabijena je sa 0.1 M bakrenim sulfatom, neutralizirana sa 0.1 M natrij acetatom (pH 4.0), i 0.1 M natrij fosfatom, te je 0.5 M natrij klorid (pH 7.0) korišten za vezanje]; i konačno H50 bufer [površina je prethodno oprana sa 50% akrilnitrilom (ACN), i vezanje je završeno u 10% ACN, 0.1% trifluoroctenoj kiselini]. Čipovi su ekvilibrirani dvaput sa 150 µl puferom za vezanje i napunjeni dvaput sa 25 µl frakcioniranim serumom. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi od 30 min, nevezani proteini su isprani triput sa 150 µl deionizirajućom vodom. Nakon što je površina čipa osušena, 1 µl sinapiničke kiseline (Bio-Rad Laboratories) otopljen je u 50% ACN, 0.5% trifluoroctena kiselina primijenjena je dvaput na prethodno pripremljenu površinu i onda osušena. Pomoću ProteinChip System, Series 400 (Bio-Rad Laboratories), analizirani su vežući proteini pomoću SELDI-TOF programa. Spektar skupljenih proteina bio je između 2 i 100 kDa sa fokusom na masu od 8 kDa. Upotrijebljeno je 530 laserskih pulseva energije od 3000 nJ. Masena kalibracija učinjena je pomoću ProteinChip All-in-One Protein Standard II (Bio-Rad Laboratories). Cijeli spektar proteina analiziran je pomoću CiphergenExpress Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories). Spektar je ispravljen s obzirom na standard i signal između 2 and 100 kDa. Ukupna ionska struja korištena za normalizaciju bila je

između 2,000 i 100,000 m/z. Pronalazak signala (engl.peak) analiziran je automatski sa prvim prolazom signala do detekcije (engl.signal-to-noise) većim od tri te s visinom signala koji odgovara pragu od minimalno 10% ukupnog spektra. Drugi prolaz imao je signal do detekcije veći od dva sa vrijednostima m/z između 2,000 i 100,000. Tri grupe serumskih uzoraka od štakora tretiranih 4 tjedna sa sevelamerom profilirane su pomoću SELDI-TOF tehnologije: 1) sham (n= 10), 2) OVX (n= 10), i 3) OVX tretirane sevelamerom 3% (n= 8). Svaka frakcija pojedinog serumskog uzorka analizirana je neovisno. Analiza individualnog spektra učinjena je pomoću softwaera CiphergenExpress Software 3.0.

Dvodimenzionalna (2-D) elektroforeza i HPLC/MS/MS analiza.

Serum je očišćen od proteina prisutnih u velikom broju npr. transferin, albumin, i IgG pomoću visoko afinitetnog mišjeg protutijela (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Nakon čišćenja, uzorci su precipitirani sa trikloroctenom kiselinom/ acetonom i analizirani pomoću 2-D elektroforeze, prvo pomoću izoelektričnog fokusiranja i onda pomoću SDS-PAGE. Gelovi su bojani s Deep Purple bojom (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) i skenirani s Typhoon 9200 Variable Mode Imager skenerom (Amersham Biosciences), te posljedično analizirani pomoću Phoretix softwarea (Kendrick Labs,Madison,WI). Za identifikaciju proteina od interesa, relevantni spotovi su izrezani sa gela i poslani na analizu preko HPLC/MS/MS na Thermo LCQ Deca ionski “trap mass” spektrometar (Tufts University Core Facility, Boston, MA).

4.9 Statistička analiza

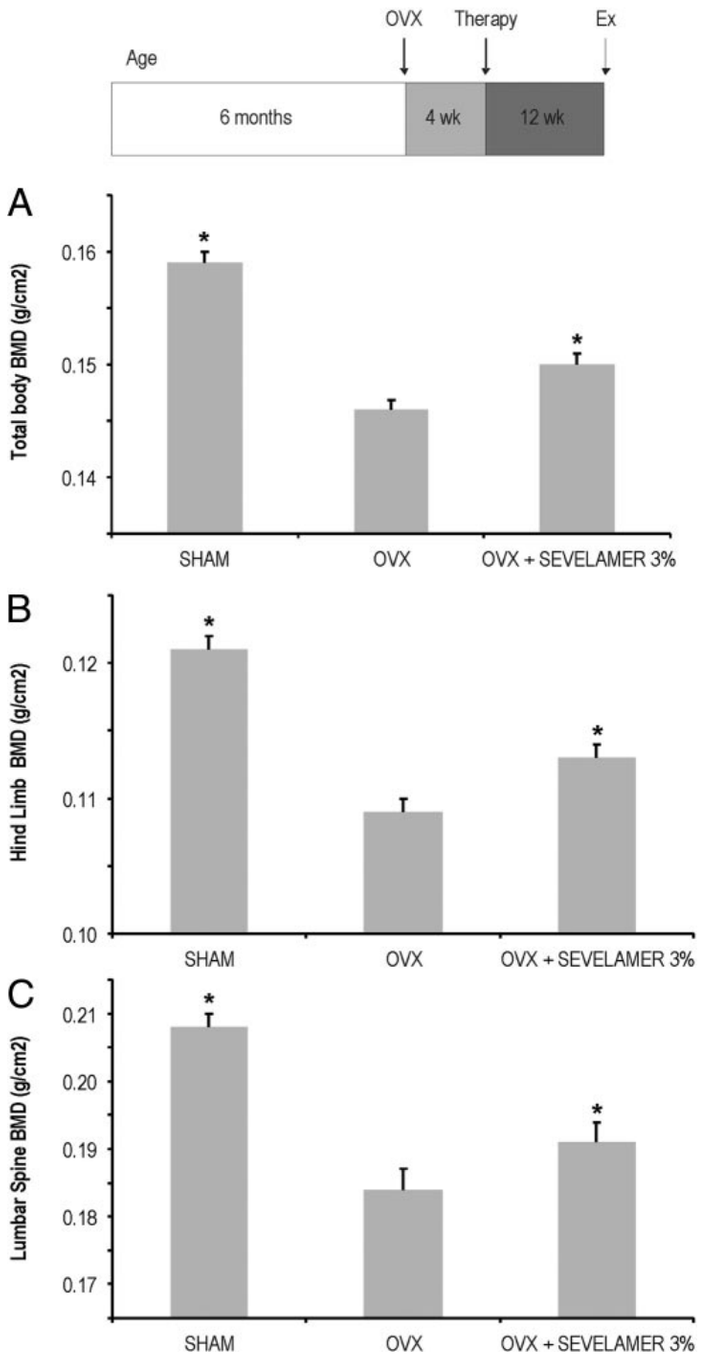
Distribucija kvantitativnih podataka učinjena je Kolmogorov-Smirnov testom. Sva mjerenja u istoj vremenskoj točki analizirana su jednosmjernim ANOVA i jednostranim Dunnett t post hoc testom između OVX i sham životinja.

5 REZULTATI

5.1 *Sevelamer vraća izgubljenu kost u OVX štakora*

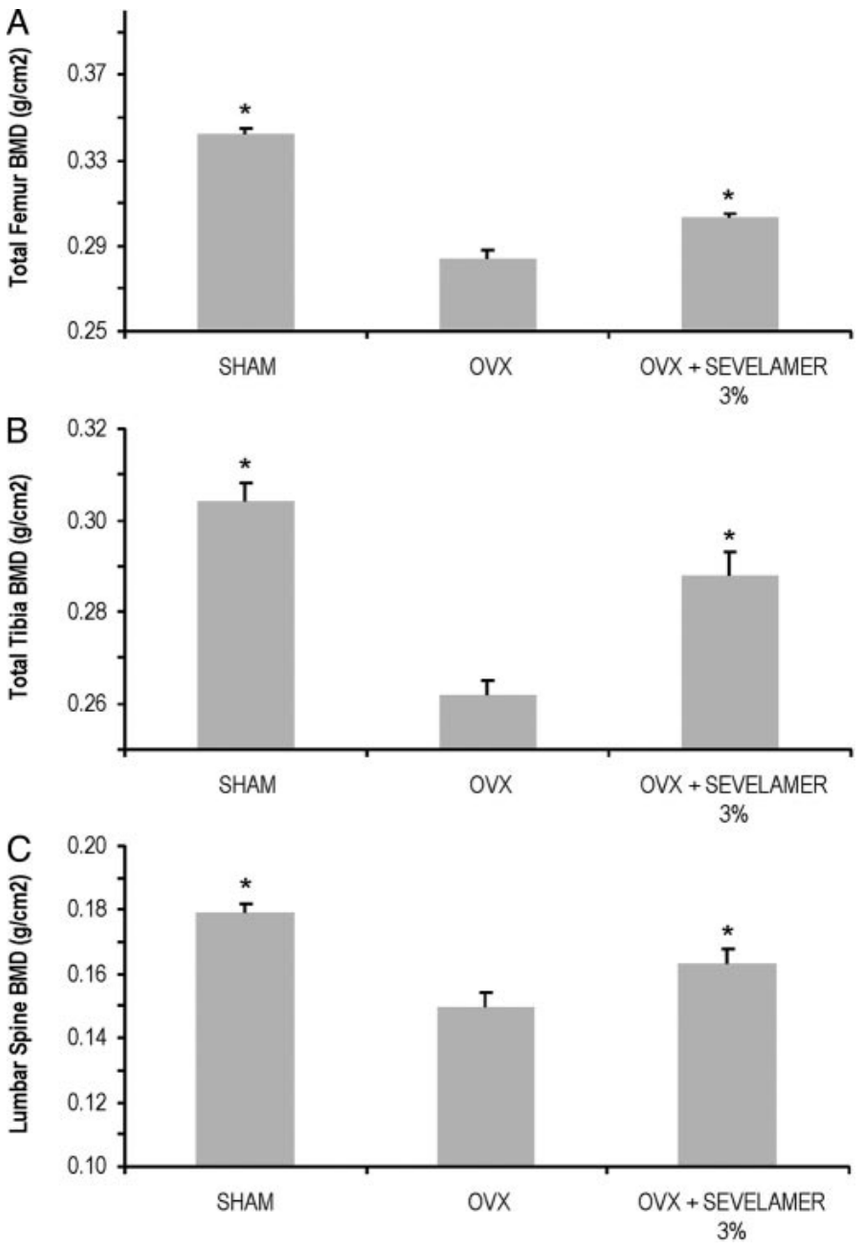
Da bi ocijenili terapeutski učinak sevelamera, OVX štakori su ostavljeni bez terapije 4 tjedna da bi se razvila osteopenija, kad je počela terapija sa sevelamerom u trajanju od 12 tjedana. U 12. tjednu terapije sa sevelamerom, *in vivo* BMD mjerenja stražnjih udova i lumbalne kralješnice bila su veća za 4%, a totalni tjelesni BMD za 3% u štakora tretiranih sevelamerom u usporedbi sa netretiranim OVX štakorima (Slika 11).

Slika 11. *In vivo BMD mjerenje cijelog tijela (A), stražnjih udova (B), i lumbalne kralješnice (C) u starih OVX štakora liječenih sa 3% sevelamerom u normalnoj hrani 12 tjedana, 4 tjedna nakon OVX. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška) . *, Statistički značajno različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n =15 u svim grupama) Ex, Ex vivo.*



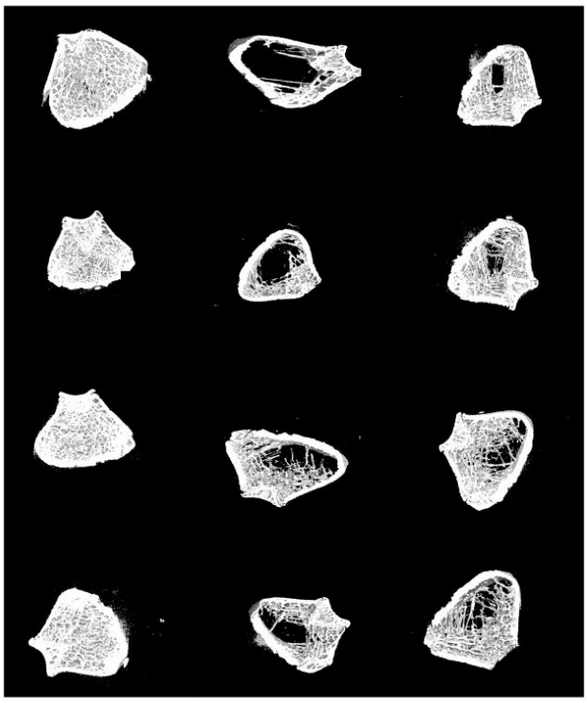
Ex vivo DEXA mjerenja pokazala su povećani BMD femura za 7%, tibije za 10%, i lumbalne kralješnice za 9%. (Slika12).

Slika 12. *Ex vivo BMD mjerenje kostiju u štakora tretiranih 3% sevelamerom u normalnoj hrani 12 tjedana, 4 tjedna nakon OVX. Ex vivo ukupni BMD femura (A), tibije (B), i lumbalne kralješnice (C) pokazao je da je sevelamer 3% učinkovit u povećanju BMD. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška)*, statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05)(n = 15 u svim grupama).*



MicroCT mjerenja distalnog femura pokazala su da je liječenje sevelamerom povećalo koštani volumen/trabekularni volumen (BV/TV) za 51%, te broj trabekula za 43%, sa skromnom promjenom u debljini trabekula od 9%. (Slika 13). Smanjen faktor stvaranja trabekula i strukturalni indeks dodatno su dokazali da sevelamer povećava koštanu strukturu i povezanost trabekularne kosti. Štoviše, u životinja koji su uzimale 3% sevelamer, značajno je bilo i povećanje u debljini korteksa za 16%. (Slika 13).

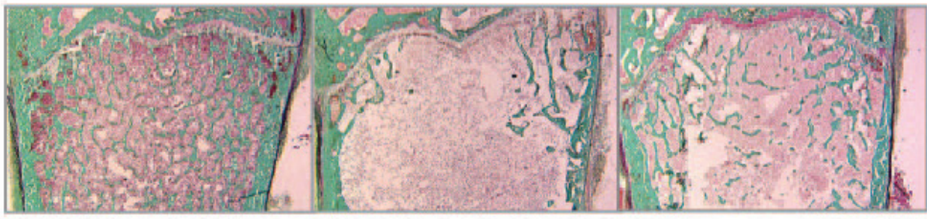
Slika 13. *MicroCT mjerenja distalnog femura u štakora sa 3% sevelamerom u normalnoj hrani 12 tjedana, 4 tjedna nakon OVX. MicroCT slike pokazuju horizontalne presjeke distalnog femura. Sevelamer je povisio koštani volumen (BV) [BV/trabekularni volumen (TV)], broj trabekula (Tr. Nm), debljinu trabekula (Tr. Th), i kortikalnu debljinu (Co.Th.), te smanjio razmak trabekula (Tr. Sp), trabekularnu formaciju (TBPf), i strukturalni indeks modela (SMI) (0-plate to 3-rode). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n = 15 u svim grupama).*



BV/TV (%)	27.74 ± 4.13*	15.11 ± 3.36	22.80 ± 4.26*
Tr. Nm (1/mm)	3.25 ± 0.56*	1.34 ± 0.27	1.91 ± 0.34*
Tr. Th (mm)	0.097 ± 0.01*	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.00
Tr. Sp (mm)	0.2 ± 0.04*	0.54 ± 0.14	0.46 ± 0.11
TBPf (1/U)	4.95 ± 2.64*	10.48 ± 1.81	7.91 ± 1.52*
SMI	1.74 ± 0.3	2.34 ± 0.35	1.75 ± 0.22
Co.Th. (mm)	0.49 ± 0.04*	0.45 ± 0.04	0.52 ± 0.04*

Histološka analiza pokazala je da je sevelamer povećao koštani volumen trabekularne kosti (BV), debljinu, i broj trabekula, a smanjio trabekularnu razdvojenost, što je potvrdilo microCT rezultate. Dinamička histomorfometrija koštanih parametara pokazala je 103% veće odlaganje minerala u kostima štakora tretiranih sevelamerom, u usporedbi sa OVX štakorima. Nadalje, označene tetraciklinske površine bile su 91% duže u štakora tretiranih sevelamerom u usporedbi sa OVX štakorima. Najvažnije od svega, brzina koštanog stvaranja bila je povećana za 25% u OVX štakora tretiranih sevelamerom u usporedbi sa OVX kontrolama. (Slika 14).

Slika 14. *Histologija i histomorfometrija distalnog femura OVX štakora tretiranih 3% sevelamerom. Sevelamer je povećao duljine oznaka tetraciklinskih površina (engl double labeled lenght-dL.Le), debljinu između oznaka (engl. Interlabel thickness- IrL.Th), brzinu odlaganja minerala (mineral apposition rate-MAR), i brzinu formiranja kostiju preko koštane površine (engl. bone formation rate/bone surface- BFR/BS), brzinu formiranja kostiju preko koštanog volumena (BV) te brzinu formiranja kostiju preko volumena trabekula (BFR/TV) što je dokazano hemalaun-eozinskim bojanjem rezova (povećanje, x12). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n = 15 u svim grupama)*



dL.Le (mm)	1.8 ± 0.12*	0.89 ± 0.46	1.7 ± 0.64*
IrL.Th (µm)	11.03 ± 1.39	9.44 ± 1.21	10.30 ± 1.66
MAR (µm/d)	1.25 ± 0.14*	0.90 ± 0.12	1.83 ± 0.17*
BFR/BS ($\mu m^3/\mu m^2/yr$)	110.86 ± 20.36*	101.53 ± 22.48	175.45 ± 39.50*
BFR/BV (%/yr)	645.78 ± 60.53*	458.72 ± 98.41	574.64 ± 87.77*
BFR/TV (%/yr)	34.55 ± 6.23*	15.97 ± 5.26	17.19 ± 9.78

„3 point bending“ test korišten je da bi se utvrdile mehaničke karakteristike dijafize femura. Maksimalno opterećenje i čvrstoća povećani su 17 i 15% u štakora tretiranih sevelamerom u usporedbi sa OVX štakorima (Tablica 4). Test indentacije korišten je

da se utvrde mehaničke karakteristike trabekula i metafize distalnih femura. Direktni parametar maksimalno opterećenje, čvrstoća i apsorbirana energija povećani su oko 12, 4 i 12 puta u štakora tretiranih sa sevelamerom u usporedbi sa OVX životinjama (Tablica 4). Maksimalna snaga pokazala je isti trend povećanja od 12x. Sevelamer je poboljšao trabekularne koštane parametre u usporedbi sa OVX štakorima, ali ne do mjere mehaničkih karakteristika sham životinja.

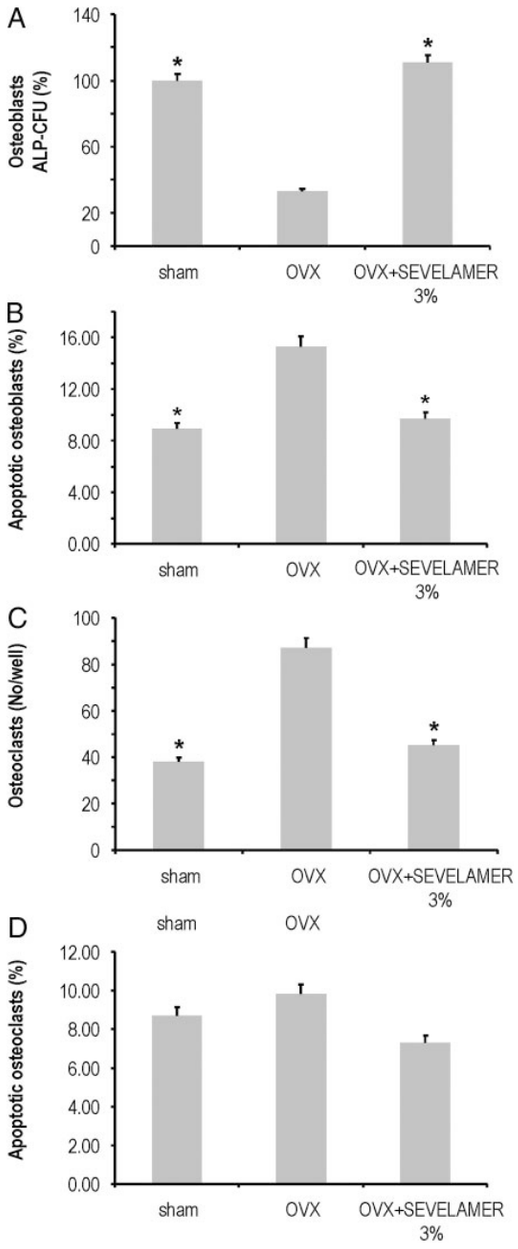
Tablica 4. *Biomehanički parametri kostiju štakora tretiranih sevelamerom. Životinje su tretirane sevelamerom 12 tjedana, počevši mjesec dana nakon OVX (n =12 u svim grupama). Podaci su mean ± SEM. Statističke značajke izražene su u odnosu na OVX grupu. Dijafiza femura podvrgnuta je 3 point bending testu do nastanka frakture. Analizirani parametri bili su slijedeći: maksimalno opterećenje (engl. maximum load -Fu), rigidnost (engl. stiffness -S), apsorbirana energija (W) i čvrstoća (engl. toughness -T). Test indentacije omogućio nam je informacije o mehaničkim značajkama trabekularne kosti. Analizirani parametri bili su: maksimalno opterećenje (engl. maximum load -Fu), rigidnost (engl. stiffness -S), apsorbirana energija (W) i maksimalna snaga (σ). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05).*

Parameters	Sham	OVX	OVX + sevelamer 3%
Three-point bending test			
F_u (N)	202.39 ± 39.05[a]	156.53 ± 32.85	183.17 ± 24 .7[a]
S (N/mm)	281.27 ± 65.96	244.37 ± 32.47	280.04 ± 28.40[a]
W (mJ)	81.81 ± 22.12[a]	58.56 ± 25.73	68.46 ± 12.98
T (MJ/m^3)	7.92 ± 2.04	5.75 ± 2.69	6.61 ± 2.01
Indentation test			
F_u (N)	57.71 ± 37.24[a]	5.10 ± 2.53	59.65 ± 24.74[a]
S (N/mm)	78.65 ± 35.37[a]	26.54 ± 6.45	101.22 ± 32.53[a]
W (mJ)	57.07 ± 37.40[a]	3.72 ± 3.06	47.23 ± 25.82[a]
$\epsilon\mu\sigma\sigma$ (N/mm^2)	18.38 ± 11.86[a]	1.62 ± 0.80	19.00 ± 7.88[a]

5.2 *Sevelamer utječe na aktivnost osteoblasta i osteoklasta u koštanoj srži*

Liječenje sevelamerom OVX štakora potiče *ex vivo* diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži (BM- mesenchymal stem cells (MSCs)) u staničnu liniju osteoblasta (70%) u usporedbi sa stanicama izoliranim iz koštane srži OVX štakora, što je dokazano brojem pozitivnih kolonija na alkalnu fosfatazu, koji se mogu usporediti sa stanicama koštane srži sham štakora. Štoviše, liječenje sevelamerom smanjilo je broj apoptotičkih osteoblasta za 37% u usporedbi s osteoblastima iz koštane srži OVX životinja. Također, RANKL-inducirana diferencijacija osteoklasta iz hematopoetskih stanica koštane srži (BM hematopoietic stem cells (HSCs)) reducirana je (48%) u OVX štakora liječenih sevelamerom, što je dokazano TRAP bojenjem pozitivnih stanica. Međutim, na broj apoptotočkih osteoklasta, sevelamer nije imao utjecaja (Slika 15).

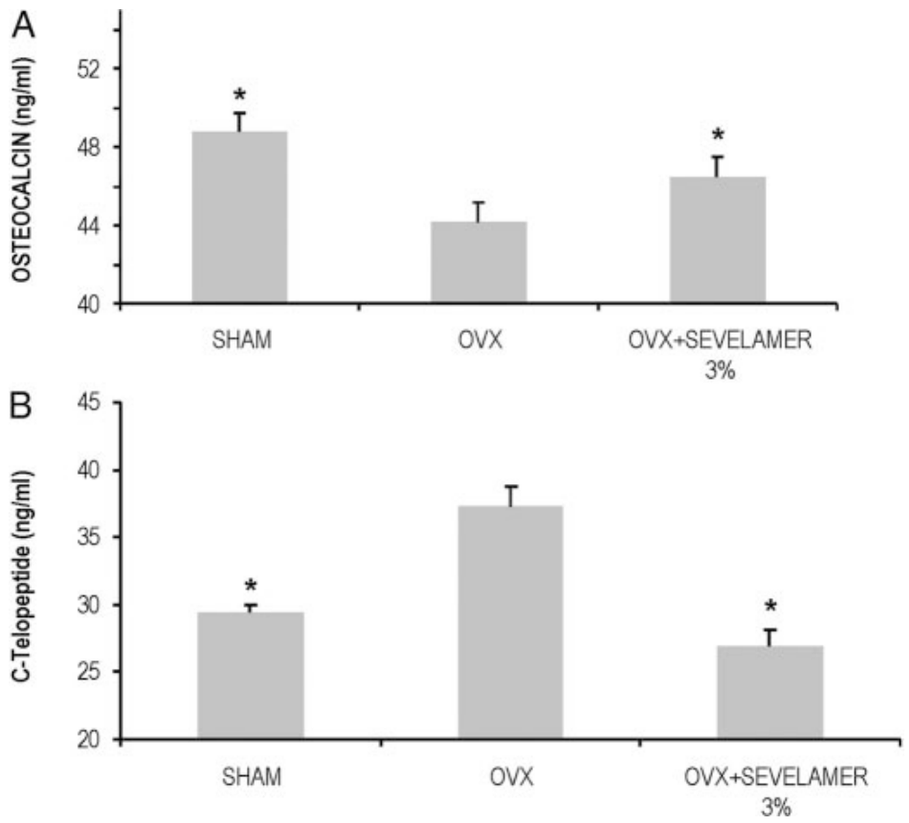
Slika 15. *A. Postotak pozitivnih kolonija formiranja kosti na alkalnu fosfatazu (koštani čvorići) u usporedbi sa primarnom BM-MSC kulturom sham životinja pregledanih nakon 14 dana; B. Postotak progenitora apoptotičkih osteoblasta mjerenih protočnom citometrijom pomoću aneksina i propidijum jodida u BM-MSC kulturama; C. Broj RANKL-induciranih TRAP pozitivnih osteoklasta u primarnoj BM-HSC kulturi nakon 6 dana; D. Postotak apoptotičkih osteoklasta mjerenih protočnom citometrijom aneksina i propidijum jodida u BM-MSC kulturama; Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05). Podaci prezentirani odgovaraju trima različitim pokusima stanične kulture sa tri replikata staničnih jažica unutar svakog pokusa. ALP-CFU-engl.Alkaline phosphatase-expressing colony-forming units, jedinice formiranja pozitivne na alkalnu fosfatazu.*



5.3 *Serumska biokemija*

Sevelamer povećava serumski osteokalcin, marker koštane izgradnje za 7%, te smanjuje kolagenski C telopeptid , marker koštane razgradnje za 28%, u usporedbi sa OVX štakorima (Slika 16, A i B).

Slika 16. *Serumski markeri koštane pregradnje u štakora tretiranih sa 3% sevelamerom u normalnoj hrani 12 tjedana, 4 tjedna nakon OVX. Sevelamer je povisio serumske vrijednosti osteokalcina (A) te snizio serumske vrijednosti C telopeptida (B). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n = 15 u svim grupama).*



Terapija sevelamerom nadalje je snizila razinu serumskog fosfata u OVX štakora za 20%, povisio razinu serumskog kalcija za 3.3% te snizio vrijednosti serumskog magnezija za 10% u usporedbi sa OVX štakorima u točki mjerenja nakon terapije (Tablica 5).

Tablica 5. *Biokemijski parametri u serumu štakora tretiranih sevelamerom i ovarijektomiranih štakora.* Štakori su liječeni sevelamerom u normalnoj hrani 12 tjedana, počevši *od 4 tjedna nakon ovarijektomije. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). [α], Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n = 12 u svim grupama). PO4-Fosfati.*

Groups	PO_4 (mmol/liter)	Ca (mmol/liter)	Mg (mmol/liter)
Sham	$1.47 \pm 0.35^{\alpha}$	3.04 ± 0.11	0.96 ± 0.05
OVX	1.83 ± 0.24	2.74 ± 0.08	0.92 ± 0.06
OVX + Sevelamer 3%	$1.53 \pm 0.26^{\alpha}$	2.83 ± 0.10	$0.80 \pm 0.11^{\alpha}$

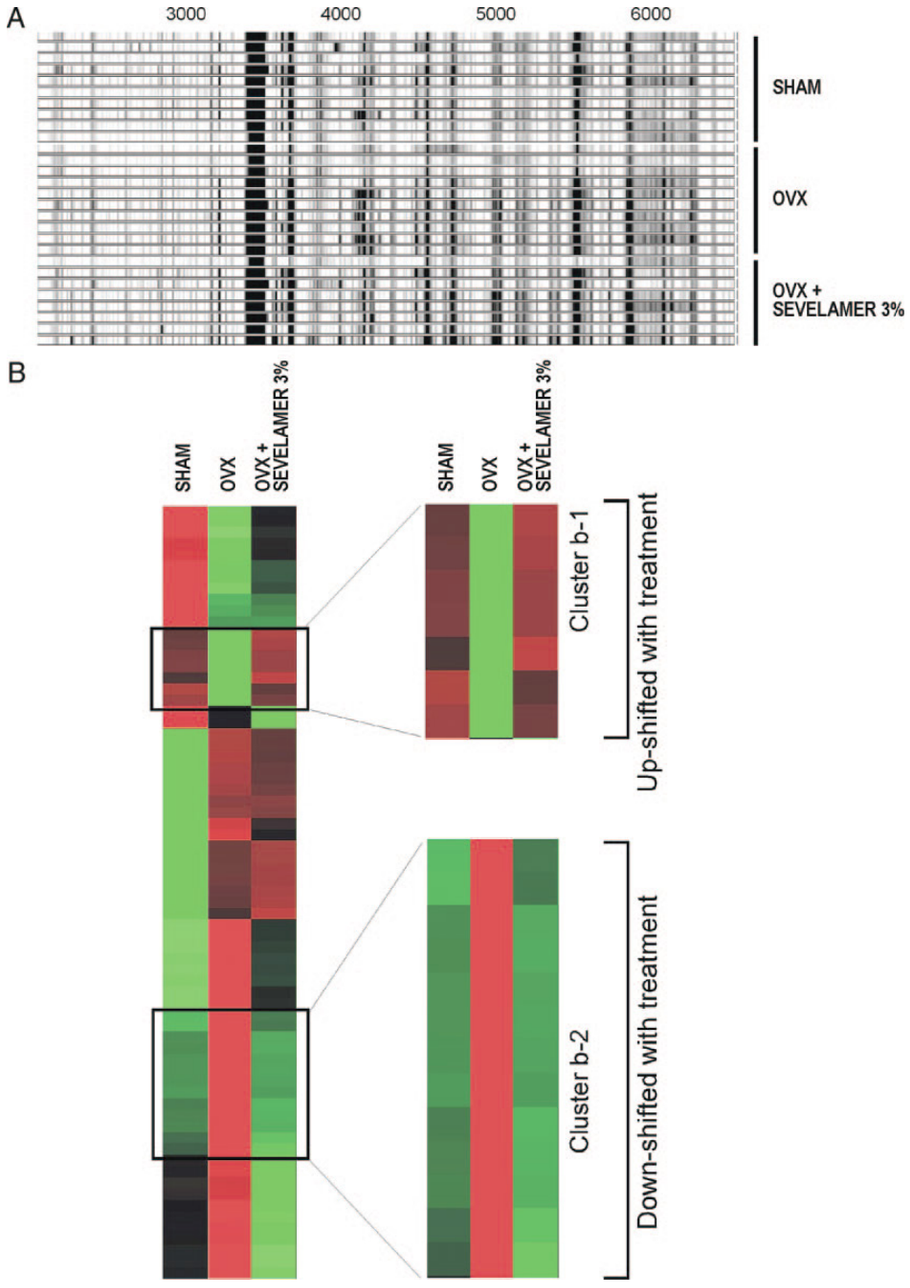
Profil citokina u serumu nije pokazao značajnu promjenu, osim skromnih promjena u citokinima IL-5, IL-9, IL-17, te granulocitno makrofagnom- CSF u štakora tretiranih sa sevelamerom. PTH I FGF 23 vrijednosti u serumu odgovorni za homeostazu kalcija i fosfata nisu bili značajno promijenjeni u štakora tretiranih sevelamerom.

5.4 *Proteomska analiza*

Serumska proteomska analiza SELDI-TOF masenom spektrofotometrijom (MS) pokazala je visok stupanj sličnosti u spektru iste pokusne grupe, što pokazuje dobru reproducibilnost podataka (Slika. 17A). Analize skupina pomoću CiphergenExpress softwarea 3.0 pokazale su da je 69 proteina različito izraženo u 2 pokusne grupe, sham i OVX (sa minimalno 1.5 X izraženom razlikom u ekspresiji). Mapa tih markera prikazana je lijevo na slici 17B. Daljnje analize tih setova markera rezultirale su podskupinom od 20 markera, čija je ekspresija vrlo slična sham životinjama (Slika 17B). U toj podgrupi identificirali smo sedam markera koja su bila regulirana pozitivnom spregom (Slika 17B, cluster b-1) i 13 markera koja su bila regulirana negativnom spregom nakon uzimanja sevelamera (Slika 17B, cluster b-2). Ta podgrupa markera na koje sevelamer utječe predstavlja otprilike 30% (20 od 69) markera koji su pronađeni različito izraženi između sham i OVX životinja. Taj pronalazak podržava teoriju o sistemskom učinku sevelamera na ukupne serumske proteine u OVX životinja. Iako su biomarkeri dobiveni SELDI-TOF

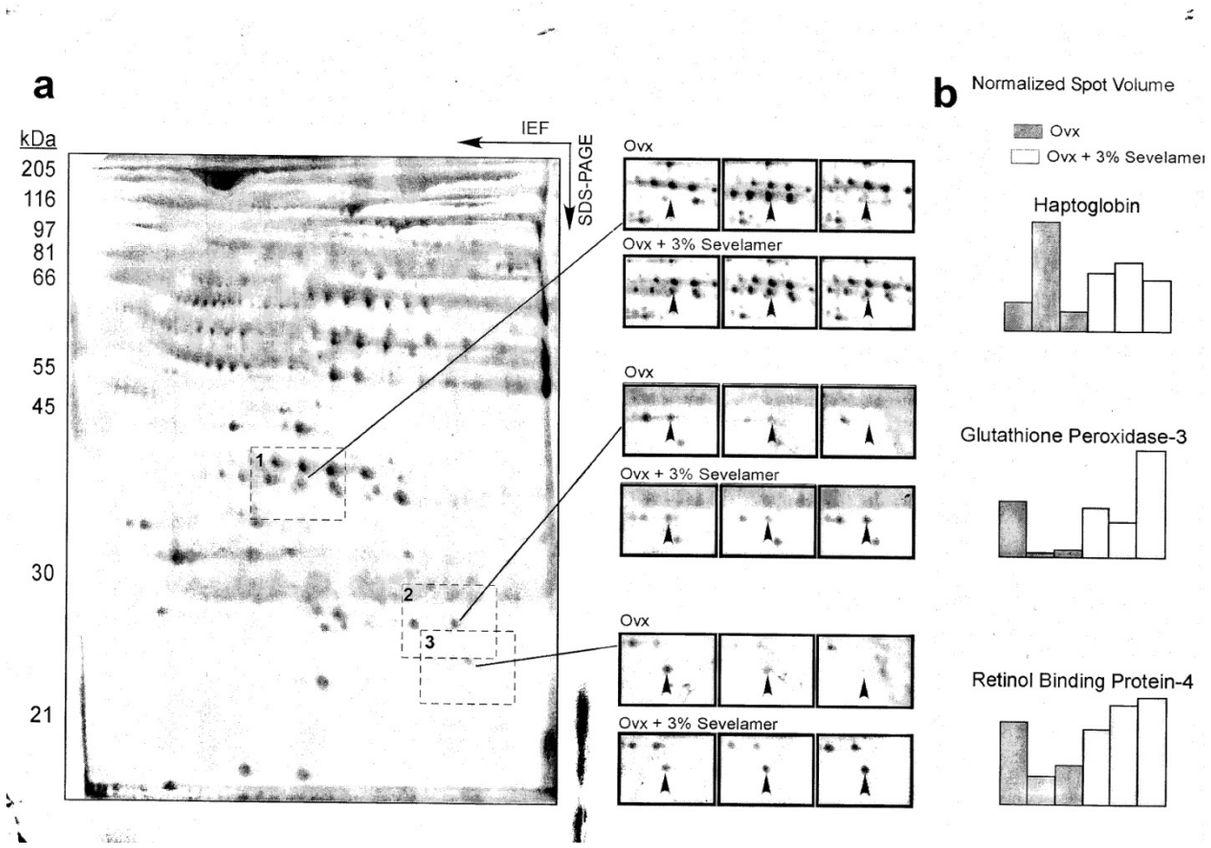
tehnologijom bili nepoznati, tehnologija je vrlo pouzdana da se dobije biomarkerski profil za procjenu terapeutskog učinka na serumske proteine.

Slika 17. *SELDI-TOF profil serumskih uzoraka. A. Gel pokazuje pojedine serumske uzorke dobivene iz tri pokusne grupe (m/z u rasponu od 2–6.5 kDa; CM10 površina): sham, OVX i OVX plus sevelamer 3%; B. Skupna (engl.cluster) mapa (lijevo) pruža analizu relativne ekspresije 69 različitih markera (minimalno x1.5-puta razlika u ekspresiji sham vs. OVX). Razina ekspresije označena je bojom (crvena i zelena predstavljaju pozitivnu odnosno negativnu regulaciju proteina sevelamerom; crna prikazuje da nema promjene u ekspresiji). Mapa pokazuje intenzitet dobiven digitalno iz prosjeka vrijednosti individualnih uzoraka. Skupna analiza identificirala je nekoliko nakupina markera koja su, nakon tretmana sa sevelamerom, svoju ekspresiju vratila na razinu kao u sham životinja (desno).*



2-D elektroforeza i HPLC/MS/MS analiza serumskih proteina pokazala je da su haptoglobin, glutaton peroksidaza-3, i retinol vežući protein-4 slabije izraženi u OVX štakorima, te je terapija sevelamerom povećala i stabilizirala njihovu razinu u serumu (Slika 18).

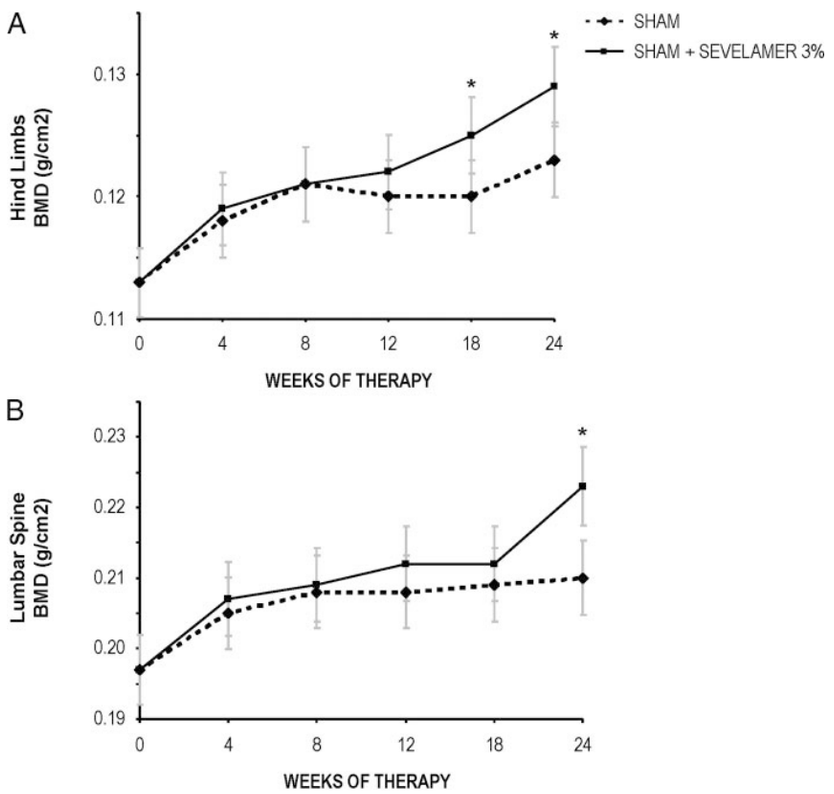
Slika 18. *A. 2-D elektroforeza i HPLC/MS/MS analiza serumskih proteina. B. Identificirani haptoglobin, glutation peroksidaza-3, i retinol vežući protein-4 u OVX štakorima i OVX štakorima tretiranih sevelamerom (n=3). Terapija sevelamerom povećala je i stabilizirala razinu navedenih proteina u serumu.*



5.5 *Sevelamer povećava koštanu masu u sham štakora*

Da bi ocijenili učinak sevelamera na kost u jednako starih sham štakora bez osteopenije, davanje sevelamera u prehrani produženo je na 25 tjedana sham životinjama. Do 12 tjedna nakon početka terapije in vivo BMD mjerenja stražnjih udova i lumbalne kralješnice nisu pokazala statistički značajnu razliku u usporedbi sa sham štakorima. Međutim, na kraju 24. tjedna uzimanja sevelamera, BMD stražnjih udova porastao je za 5% te lumbalne kralješnice za 6% u usporedbi sa netretiranim sham životinjama (Slika 19.)

Slika 19. *In vivo BMD mjerenja stražnjih udova (A) i lumbalne kralješnice (B) kroz vrijeme u sham štakora tretiranih sa 3% sevelamerom u normalnoj hrani kroz 24 tjedna. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). *, Statistički različiti od OVX (ANOVA Dunnett test, P ≤ 0.05) (n = 10 u svim grupama).*



5.5.1 Biomehanički pokazatelji djelovanja sevelamera u sham životinja

Naši rezultati u sham životinja tretiranih sevelamerom 3% pokazali su da je sevelamer imao primarni učinak na trabekularnu kost. Test indentacije je pokazao da su, u usporedbi sa sham životinjama netretiranih sevelamerom, štakori koji su u ishrani dobivali sevelamer 3% u razdoblju od 25 tjedana, imali parametre maksimalnog opterećenja (Fu) veće za 26.2%, apsorbirane energije (W) za 24.2% te maksimalne snage (σ)za 26.2%, međutim bez statistički značajne razlike. Sevelamer u tih životinja nije imao utjecaj na rigidnost (S) trabekularne kosti (Tablica 6). U 3 point bending testu sevelamer nije imao utjecaj na kortikalne biomehaničke parametre te nije bilo razlike između sham štakora i sham koji su uzimali sevelamer prehranom (Tablica 6).

Tablica 6. *Biomehanički parametri kostiju štakora tretiranih sevelamerom. Životinje su tretirane sevelamerom 25 tjedana. (n =10 u svim grupama). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti (engl. mean) ± SEM (srednja standardna pogreška). Dijafiza femura podvrgnuta je 3 point bending testu do nastanka frakture. Analizirani parametri bili su slijedeći: maksimalno opterećenje (engl. maximum load -Fu), rigidnost (engl. stiffness -S), apsorbirana energija (W) i čvrstoća (engl. toughness -T). Test indentacije omogućio nam je informacije o mehaničkim značajkama trabekularne kosti. Analizirani parametri bili su: maksimalno opterećenje (engl. maximum load -Fu), rigidnost (engl. stiffness -S), apsorbirana energija (W) i maksimalna snaga (σ).*

		Three Point Bending Test
Parameters	Sham	Sham + sevelamer 3%
Fu (N)	232.80±39.19 O	221.31±15.77 O
S (N/mm)	277.54±40.93	283.81±73.30
W (mJ)	116.56±54.43 O	93.83±31.19
T (MJ/m^3)	10.29±4.62	8.10±3.06
		Indentation Test
Parameters	Sham	Sham + sevelamer 3%
Fu (N)	61.59±20.43 O	83.43±37.29 O
S (N/mm)	120.78±56.3 O	116.6±21.94 O
W (mJ)	59.98±20.36 O	79.07±37.57 O
Σ (N/mm^2)	19.62±6.51 O	26.57±11.88 O

6 DISKUSIJA

U ovoj disertaciji prikazan je štakorski model osteoporoze u kojem su ovarijektomirane životinje tretirane sevelamerom putem hrane imale povećani koštani volumen, mikroarhitekturu i koštanu jakost u usporedbi sa ovarijektomiranim životinjama koje nisu primale sevelamer.

Sevelamer se u kliničkoj praksi koristi u dijaliziranih pacijenata gdje je dokazan njegov koristan učinak u redukciji kalcifikacije koronarnih arterija i aorte, kao i u povećanoj stopi preživljenja kod takvih pacijenata (86). "New to Dialysis" studija (RIND) pokazala je da je u razdoblju od 60 mjeseci, sevelamer smanjio smrtnost tih pacijenata u usporedbi s onima liječenima s kalcij karbonatom ($CaCO_{3)}$. Štoviše, sevelamer također povećava trabekularnu koštanu mineralnu gustoću (BMD) u pacijenata sa kroničnom bubrežnom bolešću (engl. Chronic Kidney Disease-CKD) (gradus 5) (67). Dakle, postoji dokazana poveznica između kronične bubrežne bolesti, kosti i arterijske kacifikacije, što je manje minerala u kostima, više je kalcifikacije u arterijama (87). Kad se koriste u liječenju hiperfosfatemije, kalcijeve soli dovode do redukcije u torakalnoj trabekularnoj i kortikalnoj koštanoj gustoći. Naprotiv, pacijenti liječeni sevelamerom imaju veći BMD, povećanu razinu serumske specifične koštane alkalne fosfataze, osteokalcin i PTH. U pacijenata s niskim intaktnim razinama PTH, sevelamer smanjuje kolagenski C telopeptid i povećava serumski osteokalcin (88), što nam dokazuje da sevelamer potiče koštanu pregradnju sistemski, iako se ne apsorbira. Spoznaja da terapija sevelamerom smanjuje razine kolagenskog C telopeptida i povećava razine osteokalcina u ovarijektomiranih (OVX) štakora dodatno potvrđuje prije navedenu činjenicu. Usporedbe učinaka sevelamera i kalcijevog $CaCO_3$ na koštanu mineralizaciju i pregradnju uzoraka ilijačne kosti, dobivenih koštanom biopsijom iz 119 kroničnih hemodijaliziranih pacijenata, (89) pokazale su da je sevelamer povećao koštano stvaranje i koštanu mikroarhitekturu te

održao mineralizaciju u usporedbi sa $CaCO_3$. Štoviše, pozitivan učinak sevelamera na koštanu pregradnju pokazan je na štakorskom modelu kronične bubrežne bolesti sa induciranom vaskularnom kalcifikacijom i adinamičkom koštanom bolesti. Upravo na tom modelu, sevelamer je reducirao vaskularnu kalcifikaciju, normalizirao serumske fosfate i povratio induciranu trabekularnu osteopeniju. Djelovanje sevelamera bilo je preko povećanja površine koštanih stanica osteoblasta i osteoklasta, te najvažnije od svega, povećanje brzine stvaranja kosti u trabekulu metafize štakorske tibije i femura (88,90). Da bi otkrili ulogu sevelamera u koštanoj pregradnji, proučavali smo učinak na štakorskom OVX modelu s visokim indeksom pregradnje kostiju zbog nedostatka estrogena, te sa intaktnom bubrežnom funkcijom. U ostarjelim OVX štakorima, sevelamer je smanjio razine serumskog fosfata bez povećanja slobodnog kalcija. Taj prolazni pad serumskog fosfata možda je povećao pulsnu sekreciju PTH, i na taj način stimulirao stvaranje kosti. Međutim, nakon četverotjedne terapije sevelamerom, PTH i FGF-23 serumske razine nisu bile različite od OVX štakora sa intaktnom funkcijom bubrega. Zbog te činjenice teško je odrediti u kojem se točno vremenskom razdoblju mogla dogoditi pulsna sekrecija PTH. Liječenje sevelamerom pacijenata na hemodijalizi ili peritonealnoj dijalizi povećava serumske razine intaktnog PTH (67). U navedenoj studiji sevelamer je smanjio razine serumskog kalcija u hemodijaliziranih pacijenata kad su prešli sa $CaCO_3$ terapije te na taj način povećao razine PTH, što je naposljetku rezultiralo povećanjem serumske razine biljega koštane pregradnje (88). Moguće je da pacijenti sa relativnim hipoparatiroidizmom mogu imati koristi od liječenja sevelamerom u usporedbi sa $CaCO_3$, u svrhu sprečavanja incidencije adinamičke bolesti kostiju. Da li sevelamer pomaže u poboljšanju koštanih parametara u postmenopauzalnoj osteoporozi, preostaje još ispitati. Rezultati ove studije pokazuju da sevelamer u osteoporotičnih štakora sa normalnom bubrežnom funkcijom vraća izgubljeni koštani volumen (BV) i koštanu jakost povečavajući koštano stvaranje i smanjujući koštanu resorpciju.

Uzimanje sevelamera također je rezultiralo povećanom diferencijacijom osteoblasta iz mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži (BM- mesenchymal stem cells (MSCs)

te redukcijom apoptoze osteoblasta, što je dodatno pojačano sa smanjenom RANKL-induciranom diferencijacijom osteoklasta u kulturi hematopoetskih stanica koštane srži (BM hematopoietic stem cells (HSCs)). Osteoporoza je rezultat neravnoteže u staničnim funkcijama na taj način da postoji povećana koštana resorpcija kojom upravljaju osteoklasti, u odnosu na koštano odlaganje minerala kojom upravljaju osteoblasti (91,92). Bisfosfonati koji se trenutno koriste i selektivni estrogenski receptor modulatori (SERM) imaju učinak primarno preko inihibicije aktivnosti osteoklasta te imaju skroman učinak na vraćanje koštanog volumena (BV) (93, 94). Liječenje s rekombinantnim PTH učinkovito povećava koštanu mineralizaciju sprečavajući apoptotičku smrt osteoblasta (94,95) te djelujući na povećanje usmjerenja stromalnih stanica prema diferencijaciji osteoblasta, iako je njihov učinak dugoročno ograničen zbog sigurnosnih razloga (96,97). Siguran lijek, koji ujedno ima i antiresorptivne i anaboličke učinke, imao bi značajnu prednost u odnosu na postojeće terapeutske mogućnosti (98). Neke prijašnje studije su pokazale učinak TSH I BMP6 na razdvajanje koštanog stvaranja od razgradnje u štakorskom i mišjem modelu osteoporoze (99, 100,101). U tom slučaju sevelamer bi mogao, osim na razini regulacije serumskog fosfata i BV u dijaliziranih pacijenata, biti terapija pacijentima sa osteoporozom zbog svojih antiresorptivnih i anaboličnih efekata na koštanu pregradnju.

Iako sevelamer nije sistemski apsorbiran, on smanjuje serumski LDL i pomaže u regulaciji lipidnog profila hemodijaliziranih pacijenata (90). Štoviše, terapija sevelamerom reducira visoko osjetljiv C reaktivan protein i povećava razine fetuina, što pokazuje njegov protuupalni učinak (102). Navarro i sur. smatraju da je djelovanje sevelamera na CRP direktno preko CaxP produkta (103). Redukcija fosfata negativno djeluje na upalne kaskade regulirane fosforilacijom u protein kinaza signalnim putevima oksidativnog stresa. U HD (engl. hemodyalisis) studiji Yamada i sur. također su primijetili da je smanjenje CRP za vrijeme liječenja sevelamerom povezano s razinom fosfata. Međutim sobzirom na titracijski protokol korišten u toj studiji (pacijenti s boljom kontrolom i većom redukcijom fosfata primili su veće doze sevelamera), moguće je da je učinak na CRP bio više pleiotropske prirode nego preko direktnog smanjenja fosfata (104). U ovoj studiji

pokazali smo da je terapija sevelamerom uspjela nivelirati ekspresiju 30% proteina koji su imali različitu ekspresiju (povišenu ili sniženu) u serumu OVX štakora u usporedbi sa sham životinjama. Ta činjenica nam ukazuje da je sevelamer imao sistemski učinak na ukupni proteinski profil OVX štakora. Identifikacija biomarkera koji su podložni utjecaju sevelamera dovest će do boljeg razumijevanja mehanizma njegovog djelovanja na koštanu pregradnju. Povećane razine haptoglobina, glutation peroksidaze-3, i retinol vežućeg proteina-4 u OVX štakora pokazuju na moguću pozitivnu ulogu protiv sistemske upale jer su ti proteini povezani sa akutnom i kroničnom upalom, ishemijskim i reperfuzijskim oštećenjem, oksidativnim stresom, hipoksijom i sistemskom fibrozom (105, 106, 107, 108, 109). Učinak sevelamera na oksidativni stres preostaje još ispitati.

Daljnja evaluacija sevelamera na jednako starim sham štakorima pokazala je značajno poboljšanje BMD stražnjih udova i lumbalne kralješnice u usporedbi sa sham netretiranim životinjama, al tek nakon dužeg tretmana od 25 tjedana. To nam ukazuje da su učinci sevelamera znatno brži i izraženiji na OVX štakorima zbog veće koštane pregradnje i negativnog koštanog remodelinga. Učinak sevelamera na biomehaničke parametre također je bio statistički značajniji u OVX modelima, iako ni nakon tretiranja sevelamerom mehanička svojstva kostiju nisu dosegnula vrijednosti sham životinja. U sham životinja tretiranih sevelamerom bilo je vidljivo značajnije poboljšanje mehaničkih svojstava trabekularne kosti u odnosu na kortikalnu kost.

Ovi rezultati pokazuju da sevelamer povećava koštani volumen, mikroarhitekturu i koštanu jakost primarno u OVX životinja. U sham životinjama, gdje je koštana pregradnja normalna, sevelamer je također poboljšao fizičke i mehaničke karakteristike kostiju, međutim znatno sporije u odnosu na OVX životinje tretiranih sevelamerom.

7 ZAKLJUČCI

Iz ove studije možemo izvući slijedeće zaključke:

- Mjerenjem metodom denzitometrije (DEXA) *in vivo* u različitim intervalima pokusa te *ex vivo* na kraju pokusa dokazali smo da je hranom davan sevelamer-HCL u dozi od 3% povećao koštanu mineralnu gustoću (BMD) tibije, femura i kralješnice ovarijektomiranih štakora u životinjskom modelu osteoporoze. Nakon razvitka osteopenije, 4 tjedna nakon OVX, započela je terapija sevelamerom. U 12. tjednu terapije sa sevelamerom, *in vivo* BMD mjerenja stražnjih udova i lumbalne kralješnice kao i ukupni tjelesni BMD u štakora tretiranih sevelamerom bila su povećana u usporedbi sa netretiranim OVX štakorima. *Ex vivo* DEXA mjerenja pokazala su također povećani BMD femura i tibije u usporedbi s OVX životinjama. Rezultati su bili statistički značajni u odnosu na OVX. U pokusu dodavanja sevelamera sham štakorima bez OVX, odnosno osteopenije, *in vivo* BMD mjerenja stražnjih udova i lumbalne kralješnice pokazala su statistički značajnu razliku u usporedbi sa sham štakorima tek krajem 24. tjedna terapije u usporedbi sa netretiranim sham životinjama. Iz navedenih podataka zaključujemo da sevelamer vraća izgubljenu kost u OVX i sham štakora, međutim s bržim i učinkovitijim djelovanjem u modelu OVX, najvjerovatinje zbog veće koštane pregradnje.

- MicroCT mjerenja distalnog femura pokazala su da je liječenje sevelamerom povećalo koštani volumen/trabekularni volumen (BV/TV), broj trabekula te debljinu trabekula značajno u usporedbi sa OVX štakorima. Smanjen faktor stvaranja trabekula i strukturalni indeks dodatno su dokazali da sevelamer povećava koštanu strukturu i povezanost trabekularne kosti. Štoviše, u životinja koji su uzimale 3% sevelamer, značajno je bilo i povećanje u debljini korteksa kosti.

- Histološka analiza pokazala je da je sevelamer povećao koštani volumen trabekularne kosti (BV), debljinu, i broj trabekula, a smanjio trabekularnu razdvojenost, što je potvrdilo microCT rezultate. Dinamička histomorfometrija koštanih parametara pokazala je statistički značajno izraženije odlaganje minerala u kostima štakora tretiranih sevelamerom, kao i povećanu brzinu koštanog stvaranja u usporedbi usporedbi sa OVX štakorima.

- Biomehaničkim testovima „3 point bending“ testom i testom indentacije prikazali smo učinak sevelamera na mehaničke karakteristike kortikalne i trabekularne kosti dijafize i metafize distalnih femura. Sevelamer je poboljšao kortikalne i trabekularne koštane parametre u usporedbi sa OVX štakorima, ali ne do mjere mehaničkih karakteristika sham životinja. U sham životinja tretiranih sevelamerom bilo je vidljivo značajnije poboljšanje mehaničkih svojstava trabekularne kosti u odnosu na kortikalnu kost.

- Liječenje sevelamerom utječe na osteoblaste i osteoklaste u OVX štakora. Sevelamer potiče *ex vivo* diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži u staničnu liniju osteoblasta. Štoviše, broj pozitivnih kolonija na alkalnu fosfatazu u OVX štakora liječenih sevelamerom, može se usporediti sa stanicama koštane srži sham štakora. Nadalje, sevelamer smanjuje broj apoptotičkih osteoblasta. Također, RANKL-inducirana diferencijacija osteoklasta iz hematopoetskih stanica koštane srži reducirana je kod OVX štakora liječenih sevelamerom. Međutim, na broj apoptotočkih osteoklasta, sevelamer nije imao utjecaja.
- Sevelamer utječe na markere koštane pregradnje, statistički značajno povećava serumski osteokalcin, marker koštanog stvaranja, te smanjuje kolagenski C telopeptid, marker koštane razgradnje u usporedbi sa OVX štakorima.

- Terapija sevelamerom snizila je razinu serumskog fosfata i magnezija u odnosu na OVX štakore. Razina serumskog kalcija u štakora liječenih sevelamerom bila je nešto viša u odnosu na OVX štakore, međutim bez statistički značajne razlike te razlike u odnosu na sham. Ovom studijom pokazali smo da sevelamer snizuje razine serumskog fosfata bez povećanja slobodnog kalcija.

- Profil citokina u serumu nije pokazao značajnu promjenu, osim skromnih promjena u citokinima IL-5, IL-9, IL-17, te granulocitno makrofagnom- CSF u štakora tretiranih sa sevelamerom.

- PTH I FGF 23 vrijednosti u serumu odgovorni za homeostazu kalcija i fosfata nisu bili značajno promijenjeni u štakora tretiranih sevelamerom.

- Sevelamer ima sistemski učinak na ukupne serumske proteine u OVX životinja što smo pokazali serumskom proteomskom analizom pomoću SELDI-TOF masene spektrofotometrije (MS). Identificirana je podskupina od 30% (20 od 69) markera na koje sevelamer utječe (povisuje odnosno snizuje njihovu ekspresiju), a različito su izraženi između sham i OVX životinja. Sevelamer je vratio ekspresiju tih proteina na razinu ekspresije sham životinja.

- Sevelamer ima mogući učinak protiv sistemske upale. 2-D elektroforezom i HPLC/MS/MS analizom serumskih proteina identificirani su haptoglobin, glutation peroksidaza-3, i retinol vežući protein-4. Terapija sevelamerom povećala je i stabilizirala razinu tih proteina u OVX štakorima. Dokazano je da su ti proteini povezani s upalom, ishemijom te oksidativnim stresom u stanicama.

7.1 *Znanstveni doprinos*

Danas se sevelamer hidroklorid (Renagel®, Genzyme) koristi u liječenju hiperfosfatemije u pacijenata na hemodijalizi. Sigurnost i učinkovitost sevelamera u pacijenata koji nisu na dijalizi nije još istraživana. Međutim, sevelamer se davao zdravim dobrovoljcima u dozi do 14g dnevno tijekom 8 dana, bez ikakvih nuspojava. Pošto se sevelamer ne apsorbira, rizik sistemske toksičnosti je nizak. Smanjenje kalcifikacije krvnih žila, LDL-a , inflamatornih citokina kao što je CRP, te poboljšanje koštane strukture i mineralne gustoće, neke su od karakteristika sevelamera koje su naknadno istraživane, a za koje sevelamer nije još registriran. Glede niske toksičnosti sevelamera i njegove lagane oralne primjene, te brojnih dosadašnjih kliničkih istraživanja, klinička studija o utjecaju sevelamera na osteoporozu u pacijenata koji nisu na hemodijalizi bila bi od velike koristi. U ovom modelu, međuostalom, pokazali smo da sevelamer ima utjecaj na vraćanje izgubljene kosti u štakorskom modelu osteoporoze te da djeluje dvojako: anabolički, kao i antiresorptivno, bez štetnih nuspojava. Koštani parametri, mikroarhitektura i biomehaničke karakteristike pokazuju značajke normalne kosti, a djelovanje na smanjenje serumskih fosfata je bez značajnijeg djelovanja na serumski slobodni kalcij. Nadalje, iako se ne apsorbira, ima sistemski učinak na proteinski profil štakora, a njegov protuupalni efekt vidljiv je i u našem modelu gdje je stabilizirao i nivelirao ekspresiju haptoglobina, glutation peroksidaze-3, i retinol vežući protein-4. Zbog svih tih navedenih karakteristika, sevelamer ima potencijal za novi lijek u liječenju osteoporoze i u pacijenata koji nisu na hemodijalizi, a ovo istraživanje je dobra eksperimentalna i teoretska podloga daljnjim kliničkim studijama.

8 SAŽETAK

Sevelamer hidroklorid (HCl)(Renagel®, Genzyme) fosfatni je vezač koji ne sadrži kalcijeve soli, ne apsorbira se u probavnoj cijevi niti razgrađuje u crijevima. Sevelamer-HCl učinkovito smanjuje crijevnu apsorpciju fosfata, smanjujući tako koncetraciju fosfata u serumu, zatim smanjuje koncetraciju kalcijevog i fosfatnog (Ca x P) produkta te sekreciju paratiroidnog hormona (PTH-a), smanjuje kalcifikaciju aorte i koronarnih arterija te povećava gustoću trabekularne kosti u pacijenata s kroničnom bubrežnom insuficijencijom. U pacijenata liječenih sevelamerom primjećena je također smanjena razina C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu, smanjen ukupni i LDL kolesterol, te povećana razina HDL kolesterola.

Ovim istraživanjem prikazan je utjecaj sevelamera na kost u štakorskom modelu osteoporoze. Terapija sevelamer-HCl-om u koncentraciji od 3% davana je štakorima mjesec dana nakon ovarijektomije (OVX), kad se razvila osteopenija, kroz 12 tjedana u skupinama (1) Sham; (2) OVX; (3) OVX + sevelamer 3% (n=15 u svim grupama); odnosno sham životinjama iste starosti kroz 25 tjedana u skupinama 1) Sham; (2) Sham + sevelamer 3% (n=10 u svim grupama). Sevelamer je vratio izgubljenu kost u osteopeničnih OVX štakora. U 12. tjednu pokusa, *in vivo* koštana mineralna gustoća [BMD (engl.bone mineral density)] stražnjih udova i lumbalne kralješnice bila je veća za 4%, a totalni tjelesni BMD za 3% u štakora tretiranih sevelamerom u usporedbi sa OVX štakorima. *Ex vivo* denzitometrijska (DEXA) mjerenja pokazala su povećani BMD femura za 7%, tibije za 10%, i lumbalne kralješnice za 9%. U sham pokusu *in vivo* BMD mjerenja stražnjih udova i lumbalne kralješnice pokazala su statistički značajnu razliku u usporedbi sa sham štakorima tek na kraju 24. tjedna uzimanja sevelamera, kada je BMD stražnjih udova porastao za 5% te lumbalne kralješnice za 6% u usporedbi sa netretiranim sham životinjama. MicroCT mjerenja distalnog femura pokazala su povećani

koštani volumen/trabekularni volumen (BV/TV) za 51%, broj trabekula (Tr. Nm) za 43%, te debljinu trabekula (Tr. Th) za 9%. Smanjen faktor stvaranja trabekula (TBPf) i strukturalni indeks (SMI) dodatno su potvrdili da sevelamer povećava koštanu strukturu i povezanost trabekularne kosti. Značajno je bilo i povećanje u debljini korteksa (Co. Th.) za 16%. Histološka analiza potvrdila je microCT rezultate, sevelamer je povećao koštani volumen (BV) trabekularne kosti, Tr. Nm , Tr. Th, a smanjio trabekularnu razdvojenost (Tr. Sp). Dinamička histomorfometrija pokazala je 103% veće odlaganje minerala u kostima štakora tretiranih sevelamerom, a brzina koštanog stvaranja bila je povećana za 25% u odnosu na OVX štakore. Biomehaničke karakteristike kortikalne i trabekularne kosti dijafize odnosno distalne metafize femura mjerene „3 point bending" testom i testom indentacije pokazala su da je sevelamer poboljšao trabekularne koštane parametre u usporedbi sa OVX štakorima, ali ne do mjere mehaničkih karakteristika sham životinja. Naši rezultati u sham životinja tretiranih sevelamerom 3% pokazali su da je sevelamer imao primarni učinak na trabekularnu kost. Djelovanje sevelamera na stanice koštane pregradnje bilo je dvojako. Liječenje sevelamerom OVX štakora potiče *ex vivo* diferencijaciju mezenhimalnih matičnih stanica koštane srži u staničnu liniju osteoblasta (70%) u usporedbi sa stanicama izoliranim iz koštane srži OVX štakora, te smanjuje broj apoptotičkih osteoblasta za 37% u usporedbi s osteoblastima iz koštane srži OVX životinja. RANKL (receptor aktivator nuklearnog faktora -κB ligand) -inducirana diferencijacija osteoklasta iz hematopoetskih stanica koštane srži reducirana je 48% u OVX štakora liječenih sevelamerom. Na broj apoptotočkih osteoklasta, sevelamer nije imao utjecaja. Nadalje, sevelamer povećava serumski osteokalcin, biljeg koštane izgradnje za 7%, te smanjuje kolagenski C telopeptid, biljeg koštane razgradnje za 28%, u usporedbi sa OVX štakorima. Terapija sevelamerom snizila je razinu serumskog fosfata za 20% i magnezija za 10% u odnosu na OVX štakore. Razina serumskog kalcija bila je nešto viša u odnosu na OVX štakore (3.3%), međutim bez statistički značajne razlike u odnosu na sham. PTH I FGF 23 vrijednosti u serumu odgovorni za homeostazu kalcija i fosfata nisu bili značajno promijenjeni u štakora tretiranih sevelamerom. Sevelamer

ima sistemski učinak na ukupne serumske proteine u OVX životinja što smo pokazali serumskom proteomskom analizom pomoću SELDI-TOF masene spektrofotometrije (MS). Identificirana je podskupina od 30% (20 od 69) biljega na koje sevelamer utječe (povisuje odnosno snizuje njihovu ekspresiju). Sevelamer je vratio ekspresiju tih proteina na razinu ekspresije sham životinja. 2-D elektroforezom i HPLC/MS/MS analizom serumskih proteina identificirani su haptoglobin, glutation peroksidaza-3, i retinol vežući protein-4. Terapija sevelamerom povećala je i stabilizirala razinu tih proteina u OVX štakorima. Dokazano je da su ti proteini povezani s upalom, ishemijom te oksidativnim stresom u stanicama što potvrđuje da sevelamer ima mogući učinak protiv sistemske upale.

Zaključno, u ovoj disertaciji pokazano je na štakorskom modelu osteoporoze da sevelamer ima izraženi sistemski učinak na koštanu pregradnju, povećava koštani volumen, mikroarhitekturu i koštanu jakost, djelujući dvojako anabolički i antiresorptivno, bez štetnih nuspojava. Te karakteristike, te već registrirana uporaba u kliničkoj praksi klasificiraju sevelamer kao novi potencijalni lijek za osteoporozu, odnosno klinička istraživanja na tom području.

Hrv: sevelamer, koštani markeri, koštana pregradnja, BMD

9 SUMMARY

The Effect of Sevelamer on the Bone Volume in the Rat Model of Osteoporosis, 2013

Sevelamer hydrochloride is a calcium free, nonabsorbable phosphate binder. It reduces phosphate intestinal absorption, thus lowering phosphate serum levels, Ca x P product, PTH, which consequently lowers vascular calcification and improves trabecular bone mineral density (BMD) in hemodialysis patients. Sevelamer's effect on the bone in the rat model of osteoporosis was investigated. Sevelamer HCl of 3% was given to rats for 12 weeks, one month after ovariectomy (OVX) and in sham animals without OVX through 25 weeks. Sevelamer restored lost bone in the osteoporotic OVX rats which was confirmed by *in vivo* and *ex vivo* BMD measurements, microCT, histology and dynamic histomorphometry. Sevelamer improved the biomechanical bone parameters. It stimulated the osteoblasts' and reduced the osteoclasts' differentiation. Sevelamer increased osteocalcin and decreased C telopeptide. It decreased serum phosphorus and magnesium, slightly increased calcium, and PTH and FGF-23 levels were not significantly changed as compared to OVX. Sevelamer had a profound impact on serum proteome profile in OVX rats demonstrated by SELDI-TOF MS analysis and 2-D electrophoresis. Sevelamer showed a systemic effect on the bone remodelling, increased bone volume, improved microarchitecture and strength, by affecting both bone formation and resorption, which makes it a potential novel medicine for the osteoporosis.

Eng: sevelamer, bone markers, bone remodelling, BMD

10 LITERATURA

1. Cvijetić S, Grazio S, Kastelan D, Korsić M. Epidemiology of osteoporosis. Arh Hig Rada Toksikol. 2007;58(1):13-8.
2. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet. 2006 ;367(9527):2010-8.
3. World Health Organization (WHO). Technical Report Series 921. Prevention and management of osteoporosis. Geneva: WHO; 2003.
4. Melton LJ. How many women have osteoporosis now?J Bone Miner Res 1995;10:175-7.
5. Giljević Z. Značaj problema osteoporoze u Hrvatskoj.U: Zbornik Svjetski dan osteoporoze; Zagreb, 2005.str. 17.
6. Kaštelan D, Kujundžić Tiljak M, Kraljević I, Kardum I, Giljević Z, Koršić M. Calcaneus ultrasound in males-normative data in the Croatian population (ECUM study). J Endocrinol Invest. 2006 Mar;29(3):221-5.
7. O´Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. The prevalence of vertebral deformity in European men and women: The European Vertebral Osteoporosis Study. J Bone Miner Res 1996;11:1010-18.
8. Ismail AA, Pye SR, Cockerill WC, Lunt M, Silman AJ, Reeve J, Banzer D, Benevolenskaya LI, Bhalla A, Bruges Armas J, Cannata JB, Cooper C, Delmas PD, Dequeker J, Dilsen G, Falch JA, Felsch B, Felsenberg D, Finn JD, Gennari C, Hoszowski K, Jajic I, Janott J, Johnell O, Kanis JA, Kragl G, Lopez Vaz A, Lorenc R, Lyritis G, Marchand F, Masaryk P, Matthis C, Miazgowski T, Naves-Diaz M, Pols HA, Poor G, Rapado A, Raspe HH, Reid DM, Reisinger W, Scheidt-Nave C, Stepan J, Todd C, Weber K, Woolf AD, O'Neill TW. Incidence of limb fracture cross Europe: results from European Prospectove Osteoporosis Study (EPOS). Osteoporos Int 2002;13:565-71.
9. Pećina M, Smoljanović T, Cicvara-Pećina T, Tomek-Roksandić S. Osteoporotic fractures in the elderly. Arh Hig Rada Toksikol. 2007;58(1):41-7.
10. McCulloch RG, Bailey DA, Houston CS, Dodd BL. Effects of physical activity, dietary calcium intake and selected lifestyle factors on bone density in young women. Can Med Assoc J 1990;142:221-7.

11. Sinaki M, Wahner HW, Bergstralh EJ, Hodgson SF,Offord KP, Squires RW, Swee RG, Kao PC. Three-year controlled, randomized trial of the effect of dosespecified loading and strengthening exercises on BMD of spine and femur in nonathletic, physically active women. Bone 1996;19:233-44.

12. Neville CE, Murray LJ, Boreham CA, Gallagher AM, Twisk J, Robson PJ, Savage JM, Kemper HC, Ralston SH, Davey Smith G. Relationship between physical activity and bone mineral status in young adults: the Northern Ireland Young Hearts Project. Bone 2002;30:792-8.

13. Jesudason D, Need AG. Effects of smoking on bone and mineral metabolism Endocrinologist 2002; 12:199-209.

14. Pacifici R.J. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. Bone Miner Res. 1996 Aug;11(8):1043-51. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. J Clin Invest. 2000 Nov;106(10):1229-37.

15. Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. Endocr Rev. 2002 Feb;23(1):90-119.

16. Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta.Nat Med. 1996 Oct;2(10):1132-6.

17. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. Lancet 2002;359:1929-36. Melton LJ, Atkinson EJ, Khosla S, Oberg AL, Riggs BL. Evaluation of a prediction model for long-term fracture risk. J Bone Miner Res 2005;20:551-6.

18. Šimić P, Giljević Z, Šimunić V, Vukičević S, Koršić M. Treatment of osteoporosis. Arh Hig Rada Toksikol. 2007;58(1):55-71.

19. Pennisi E. Drugs' link to genes reveals estrogen's many sides. Science 1996;273:1171. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. Mol Endocrinol 1994;8:21-30.

20. Hays J, Ockene JK, Brunner RL, Kotchen JM, Manson JE, Patterson RE, Aragaki AK, Shumaker SA, Brzyski RG, LaCroix AZ, Granek IA, Valanis BG. Effects of estrogen

plus progestin on health-related quality of life. New Engl J Med 2003;348:1839-54.

21. Black LJ, Sato M, Rowley ER. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. J Clin Invest 1994;93:63-9.

22. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. New Engl J Med 1997;337:1641-7.

23. Sambrook P. Who will benefit from treatment with selective estrogen receptor modulators (SERMs)? Best Pract Res Clin Rheumatol 2005;19:975-81.

24. Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S, Glasebrook A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17α-estradiol raloxifene.Science 1996;273:1222-5.

25. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. Mol Endocrinol 1994;8:21-30.

26. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science 1995;270:1354-7.

27. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P i sur. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. New Engl J Med 2006;355:125-37.

28. Bevers TB. Raloxifene and the prevention of breast cancer. Expert Opin Pharmacother 2006;7:2301-7.

29. Storm T, Thamsborg G, Steiniche T, Genant HK, Sorensen OH. Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. New Engl J Med 1990;322:1265-71.

30. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Monkkonen J, Rogers MJ. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. Mol Pharmacol 1999;56:131-40.

31. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Napankangas JP, Ylitalo KV,Monkkonen J, Rogers MJ, Azhayev A, Vaananen HK, Hassinen IE. Further insight into mechanism of action of

clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. Mol Pharmacol 2002;61:1255-62.

32. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. Arch Biochem Biophys 2000;373:231-41.

33. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent posttranslational prenylation of GTP-binding proteins,including Ras. J Bone Miner Res 1998;13:581-9.

34. Van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 1999;255:491-4.

35. Rodan GA, Reszka AA. Bisphosphonate mechanism of action. Curr Mol Med 2002;2:571-7.

36. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. Ann Intern Med 2006;16:753-61.

37. De Nijs RN, Jacobs JW, Lems WF, Laan RF, Algra A,Huisman AM, Buskens E, de Laet CE, Oostveen AC,Geusens PP, Bruyn GA, Dijkmans BA, Bijlsma JW. STOP Investigators. Alendronate or alfacalcidol in glucocorticoid-induced osteoporosis. New Engl J Med 2006;355:675-84.

38. Silverman SL. Calcitonin. Endocrinol Metab Clin North Am 2003;32:273-84.

39. Chambers TJ, Moore A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. J Clin Endocrinol Metab 1983;57:819-24.

40. Mehta NM, Malootian A, Gilligan JP. Calcitonin for osteoporosis and bone pain. Curr Pharm Des 2003;9:2659-76.

41. Ofluoglu D, Akyuz G, Unay O, Kayhan O. The effect of calcitonin on beta-endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. Clin Rheumatol 2007;26:44-9.

42. Lyritis GP, Trovas G. Analgesic effects of calcitonin.Bone 2002;30:71-4.

43. Miyauchi A, Notoya K, Taketomi S. Novel ipriflavone receptors coupled to calcium

influx regulate osteoclast differentiation and function. Endocrinology 1996;137:3544–50.

44. Alexandersen P, Toussaint A, Christiansen C, Devogelaer JP, Roux C, Fechtenbaum J, Gennari C, Reginster JY,Ipriflavone Multicenter European Fracture Study. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. JAMA 2001;285:1482-8.ž

45. Parsons JA, Potts JT Jr. Physiology and chemistry of parathyroid hormone. Clin Endocrino Metab 1972;1:33-78.

46. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulinlike growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. J Clin Invest 1989;8:60-5.

47. Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. Metabolism 1989;38:858-68.

48. Whitfield JF. The bone growth-stimulating PTH and osteosarcoma. Medscape Womens Health 2001;6:7.

49. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. Science 1983;222:330-2.

50. Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M,Mauras Y, Allain P, Tsouderos Y, Meunier PJ. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. J Bone Miner Res 1996;11:1302-11.

51. Marie PJ, Amman P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. Calcif Tissue Int 2001;69:121-29.

52. Delannoy P, Bazot D, Marie PJ. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. Metabolism 2002;51:906-11.

53. Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. Osteoporosis Int 2003;14(Suppl 3):S19-24.

54. Garrett IR, Chen D, Gutierrez G, Zhao M, Escobedo A,Rossini G, Harris SE, Gallwitz W, Kim KB, Hu S, CrewsCM, Mundy GR. Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. J Clin Invest 2003;111:1771-82.

55. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass indeks on bone mineral density in men and women: the Framingham Study. J Bone Miner Res 1993;8:567-73.

56. Tremollieres FA, Pouilles JM, Ribot C. Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 1993;77:683-6.

57. 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.

58. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. Eur Cell Mater. 2001;1:66-81.

59. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Walker R, Wang H. The burden of kidney disease:improving global outcomes. Kidney Int 2004; 66: 1310–1314.

60. Block GA, Cunningham J. Morbidity and mortality associated with abnormalities in bone and mineral metabolism in CKD. In: Olgaard K (ed). Clinical Guide to the Basics of Bone and Mineral Metabolism in CKD. chapter 4 National Kidney Foundation pp 77–92: New York, 2006.

61. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H 2003 Arterial media calcification in end stage renal disease: impact on all cause and cardiovascular mortality. Nephrol Dial Transplant 18:1731-1740.

62. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). Am J Kidney Dis 42(4):617-22, 2003.

63. Ribeiro S, Ramos A, Brandao A, et al. Cardiac valve calcification in haemodialysis patients. role of calcium phosphate metabolism. Nephrol Dial Transplant 13 (8): 2037-40, 1998.

64. Chertow GM, Burke SK, Raggi P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. Kidney Int. 62: 245–252, 2002.

65. Chertow GM, Dillon MA, Amin N, et al.. Sevelamer with and without calcium and vitamin D: observations from a longterm open-label clinical trial. J Ren Nutr 10: 125-32, 2000.

66. Heaney RP. Phosphorus nutrition and the treatment of osteoporosis. Mayo Clin Proc 79: 91-7, 2004.

67. Chertow GM, Raggi P, McCarthy JT, et al. The effects of sevelamer and calcium acetate on proxies of atherosclerotic and arteriosclerotic vascular disease in hemodialysis patients. Am J Nephrol 23: 307–314, 2003.

68. Raggi P, James G, Burke SK, et al. Decrease in thoracic vertebral bone attenuation with calcium-based phosphate binders in hemodialysis. J Bone Miner Res 20: 764-72, 2005.

69. Kincaid SA, Lauten SD, Wright JC 2002 In vivo whole body and appendicular bone mineral density in rats: a dual energy X-ray absorptiometry study. Comp Med 52:143–51.

70. Ke HZ, Simmons HA, Pirie CM, et al. Droloxifene, a new estrogen antagonist/agonist, prevents bone loss in ovariectomized rats. Endocrinology 136: 2435-2441, 1993.

71. Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z Vaananen HK, Tuukkanen J 1998 Comparisonof three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography, analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. Bone 23:155–161.

72. Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C 1999 Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female Erß-/- mice. J Clin Invest 104:895–901.

73. Ruegsegger P, Koller B, Mullar R 1996 A microtomographic system for the non-destructive evaluation of bone architecture. Calcif Tissue Int 58:24–29.

74. Ito M, Nakamura T, Matsumoto T, Tsurusaki K, Hayashi K 1998 Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using micro-computed tomography in patients with a hip arthrosis with or without vertebral fracture. Bone 23:163–169.

75. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ru¨ egsegger P 1999 Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneous. J Bone Miner Res 14:1167–1174.

76. Hahn M, Vogel M, Pompesious-Kempa M, Delling G 1992 Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. Bone 13:327–330 Hildebrand T, Ruegsegger P 1997 Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. Comput Methods Biomech Biomed Engin 1:15–23.

77. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM,

Recker RR 1987 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. J Bone Miner Res 2:595–610.

78. Krempien B, Vukicevic S, Vogel, Stavljenic A, Buchele R 1988 Cellular basis of inflammation-induced osteopenia in growing rats. J Bone Miner Res 3:573–582.

79. Vukicevic S, Krempien B, Stavljenic A 1987 Effects of 1,25- and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on aluminum-induced rickets in growing uremic rats. J Bone Miner Res 2:533–545.

80. Turner CH, Burr DB 1993 Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 14:595–608.

81. Meng XW, Liang XG, Birchman R, Wu DD, Dempster DW, Lindsay R, Shen V 1996 Temporal expression of the anabolic action of PTH in cancellous bone of ovariectomized rats. J Bone Miner Res 11:421–429.

82. Shen V, Birchman R, Xu R, Otter M, Wu D, Lindsay R, Dempster DW 1995 Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. J Clin Invest 96:2331–2338.

83. Buckbinder L, Crawford DT, Qi H, Ke HZ, Olson LM, Long KR, Bonnette PC, Baumann AP, Hambor JE, Grasser 3rd WA, Pan LC, Owen TA, Luzzio MJ, Hulford CA, Gerhard DF, Paralkar VM, Simmons HA, Kath JC, Roberts WG, Smock SL, Guzman-Perez A, Brown TA, LiM2007 Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis. Proc Natl Acad Sci USA 104: 10619–10624.

84. Kitaura H, Sands MS, Aya K, Zhou P, Hirayama T, Uthgenannt B, Wei S, Takeshita S, Novack DV, Silva MJ, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL 2004 Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF- -induced osteoclastogenesis in vivo. J Immunol 173:4838–4846.

85. Purohit S, Podolsky R, Schatz D, Muir A, Hopkins D, Huang YH, She JX 2006 Assessing the utility of SELDI-TOF and model averaging for serum proteomic biomarker discovery. Proteomics 6:6405–6415 Poon TC 2007 Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. Expert Rev Proteomics 4:51–65.

86. Block GA, Raggi P, Bellasi, Kooienga L, Spiegel DM 2007 Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. Kidney Int 71:438–441.

87. Burke SK, Slatopolsky EA, Goldberg DI. RenaGel, a novel calcium- and aluminum-free phosphate binder, inhibits phosphate absorption in normal volunteers. Nephrol Dial Transplant 1997;12:1640–4.

88. Iwata Y, Wada T, Yokoyama H, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Hara A, Yamahana J, Nakaya I, Kobayashi M, Kitagawa K, Kokubo S, Yoshimoto K, Shimizu K, Sakai N, Furuichi K, Koshino Y, Takeda S, Takasawa K, Ohta S, Takaeda M, Takaeda C, Kaneko S 2007 Effect of sevelamer hydrochloride on markers of bone turnover in Japanese dialysis patients with low biointact PTH levels. Intern Med 46:447–452.

89. Ferreira i dr. Ferreira A, Frazao JM, Monier-Faugere MC, Gil C, Galvao J, Oliveira C, Baldaia J, Rodrigues I, Santos C, Ribeiro S, Hoenger RM, Duggal A, Malluche HH, Sevelamer Study Group 2008 Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol 19:405– 412.

90. Mathew S, Lund RJ, Strebeck F, Tustison KS, Geurs T, Hruska KA 2007 Reversal of the adynamic bone disorder and decreased vascular calcification in chronic kidney disease by sevelamer carbonate therapy. J Am Soc Nephrol 8:122–130.

91. Manolagas SC, Jilka RL 1995 Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 332:305–311.

92. Rodan GA, Martin TJ 1981 Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. Calcif Tissue Int 33:349–351.

93. Teitelbaum SL 2000 Bone resorption by osteocalsts. Science 289:1504–1508.

94. Cauley JA, Seeley DG, Ensrud K, Ettinger B, Black D, Cummings SR 1995 Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Ann Intern Med 122:9–16.

95. Bone HG 2004 Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. N Engl J Med 350:1189–1199.

96. Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH 2001 Effect of parathyroid hormone (1–34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med 344: 1434 –1441.

97. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT 2003 Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 425:841–846.

98. Tashjian Jr AH, Gagel RF 2006 Teriparatide [Human PTH (1–34)]: 2.5 years of experience on the use of safety of the drug for the treatment of osteoporosis. J Bone Mine Res 21:354–365.

99. Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, Schiavi SC, McPherson JM, Vukicevic S 2007 Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. J Bone Miner Res 22:849–859.

100. Simic P, Culej JB, Orlic I, Grgurevic L, Draca N, Spaventi R, Vukicevic S 2006 Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. J Biol Chem 281:25509–25521

101. Sun L, Vukicevic S, Baliram R, Yang G, Sendak R, McPherson J, Zhu LL, Iqbal J, Latif R, Natrajan A, Arabi A, Yamoah K, Moonga BS, Gabet Y, Davies TF, Bab I, Abe E, Sampath K, Zaidi M 2008 Intermittent recombinant TSH injections prevent ovariectomy-induced bone loss. Proc Natl Acad Sci USA105:4289–94

102. Othmane Tel H, Bakonyi G, Egresits J, Fekete BC, Fodor E, Jarai Z, Jekkel C, Nemcsik J, Szabo A, Szabo T, Kiss I, Tisler A 2007 Effect of sevelamer on aortic pulse wave velocity in patients on hemodialysis: a prospective observational study. Hemodial Int 11(Suppl 3):S13–S21.

103. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros M, Herrera H, García J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a crosssectional study. Clin J Am Soc Nephrol 2009 Oct;4(10):1646–54.

104. Yamada K, Tokura T, Fukudome K, et al. Effect of sevelamer on dyslipidemia and chronic inflammation in maintenance hemodialysis patients. Ren Fail2005;27:361–5.

105. Rico H, Relea P, Revilla M, Hernandez ER, Arribas I, Villa LF 1993 Biochemical markers of nutrition in osteoporosis. Calcif Tissue Int 52:331–333.

106. Frohlander N, Ljunggren O, Lerner UH 1991 Haptoglobin synergistically potentiates bradykinin and thrombin induced prostaglandin biosynthesis in isolated osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 178:343–351.

107. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, CherubiniA2003 Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. J Clin Endocrinol Metab 88:1523–1527.

108. Yalin S, Bagis S, Polat G, Dogruer N, Cenk Aksit S, Hatungil R, Erdogan C 2005 Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? Clin Exp Rheumatol 23:689–692.

109. Moreno-Reyes R, Egrise D, Neve J, Pasteels JL, Schoutens A 2001 Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. J Bone Miner Res 16:1556–1563.

11 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26.06.1980. godine u Zadru. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu pohađala sam od 1998-2004. Za vrijeme studija radila sam aktivno kao demonstrator Katedre za anatomiju te u znanstveno istraživačkom timu Laboratorija za mineralizirana tkiva pod vodstvom prof. dr. sc. Slobodana Vukičevića. 2002.-2004. izabrana sam za predstavnika Vijeća studenata Medicinskog fakulteta. Pripravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici Sv. Duh u razdoblju 2004-2005. Na Katedri za anatomiju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, bila sam zaposlena od 2005-2009. kao asistent i znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti RH „Učinkovitost i mehanizmi djelovanja BMP-6 u liječenju osteoporoze“. Kao asistent na anatomiji za studente Stomatološkog fakulteta u Zagrebu radila sam od 2006.-2009., te za studente Engleskog studija Medicinskog Fakulteta u Zagrebu od 2007.-2009.godine. Znanstveni poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo pohađala sam od 2005.-2008. Od 2009. godine zaposlena sam kao specijalizant oftalmologije u Specijalnoj bolnici za oftalmologiju Svjetlost, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Specijalistički poslijediplomski studij iz oftalmologije pohađala sam 2012/2013. godine. Od 2009. član sam Hrvatskog društva za kirurgiju katarakte i refraktivnu kirurgiju i Europskog društva za kataraktu i refraktivnu kirurgiju. Autor sam 13 znanstvenih radova u časopisima registriranih u Current Contentsu te brojnih sažetaka na domaćim i stranim kongresima.