

# Značenje stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH) na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti

---

Giljević, Zlatko

Doctoral thesis / Disertacija

2008

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:425151>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Giljević, Zlatko (2008) *Značenje stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH) na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/668>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zlatko Giljević**

**Značenje stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH)  
na koštanu masu u štakorskom modelu  
osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom  
mineralnom gustoćom kosti**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, 2008.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavodu za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničke bolnice «Sestre Milosrdnice» Zagreb i u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Slobodan Vukičević

Zahvaljujem se prvenstveno mentoru prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću za svestranu pomoć koju mi je nesebično pružio tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za endokrinologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavoda za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice“ te cijelom Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i svima koji su mi bili podrška tijekom izrade ovog rada.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji i roditeljima koji od mene čine to što jesam !

## Popis oznaka i skraćenica

<b>μCT</b>	-	mikrokompjutorizirana tomografija
<b>1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	-	1-25 dihidroksi vitamin D <sub>3</sub>
<b>AK</b>	-	aminokiseline
<b>ANCOVA</b>	-	analiza kovarijance
<b>BAP</b>	-	koštana alkalna fosfataza (engl. Bone Alkaline Phosphatase)
<b>BMD</b>	-	mineralna gustoća kosti (engl. Bone Mineral Density)
<b>BMI</b>	-	indeks tjelesne mase (engl. Body Mass Index)
<b>BMPs</b>	-	koštani morfogenetski proteini (engl. Bone Morphogenetic Proteins)
<b>BUA</b>	-	brzina slabljenja ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (engl. Broadband Ultrasound Attenuation)
<b>BV</b>	-	volumen spužvaste kosti
<b>Ca/s</b>	-	kalcij u serumu
<b>CT</b>	-	kompjutorizirana tomografija
<b>CTXs</b>	-	C telopeptid kolagena tipa 1 u serumu (ili β crosslaps)
<b>DOP</b>	-	dopamin
<b>DVT</b>	-	tromboza dubokih vena
<b>DXA</b>	-	dvoenergetska apsorpciometrija X zraka (engl. Dual energy X-ray Absorptiometry)
<b>Flk</b>	-	Fetalna jetrena kinaza-1 (engl. Fetal Liver Kinase-1)
<b>FSH</b>	-	folikul stimulirajući hormon
<b>FT3</b>	-	slobodni trijodtironin
<b>FT4</b>	-	slobodni tiroksin
<b>GC</b>	-	glukokortikoidi
<b>GH</b>	-	hormon rasta (eng. Growth Hormone)
<b>hCG</b>	-	humani horionski gonadotropin
<b>HNL</b>	-	hormonsko nadomjesno liječenje
<b>i.v.</b>	-	intravenski

<b>IGF-1</b>	-	inzulinu sličan čimbenik rasta 1
<b>IGFs</b>	-	inzulinu slični čimbenici rasta
<b>IL</b>	-	interleukin
<b>IOF</b>	-	Međunarodna fondacija za osteoporozu (engl. International Osteoporosis Foundation)
<b>ISCD</b>	-	Međunarodno društvo za kliničku denzitometriju (engl. International Society for Clinical Densitometry)
<b>L1-L4</b>	-	područje 1. do 4. lumbalnog kralješka
<b>LDL</b>	-	lipoprotein niske gustoće (Engl. Low Density Lipoprotein)
<b>LH</b>	-	luteinizirajući hormon
<b>LRP-5</b>	-	LDLn receptoru sličan protein 5 (engl. Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 5)
<b>LS</b>	-	slabinska kralježnica (engl. Lumbar Spine)
<b>LT4</b>	-	levotiroksin
<b>M-CSF</b>	-	faktor stimulacije kolonije makrofaga (engl. Macrophage Colony Stimulating Factor)
<b>MR</b>	-	magnetska rezonanca
<b>neck</b>	-	vrat bedrene kosti (engl. femoral neck)
<b>NFκB</b>	-	jezgrin čimbenik κB (engl. Nuclear Factor κB)
<b>NHANES</b>	-	engl. National Health and Nutrition Examination Survey
<b>NOF</b>	-	Američka fondacija za osteoporozu (engl. National Osteoporosis Foundation)
<b>NSAR</b>	-	nesteroidni antireumatici
<b>OC</b>	-	osteokalcin
<b>OPG</b>	-	(engl. osteoprotegerin)
<b>OVX</b>	-	ovarijektomija
<b>p.o.</b>	-	na usta (per os)
<b>P/s</b>	-	anorganski fosfor u serumu
<b>PBM</b>	-	vršna koštana masa (engl. Peak Bone Mass)
<b>PE</b>	-	plućna embolija
<b>pQCT</b>	-	periferna kvantitativna kompjutorizirana tomografija
<b>PTH</b>	-	parathormon

<b>PTHrP</b>	- PTH sličan protein
<b>QCT</b>	- kvantitativna kompjutorizirana tomografija
<b>QMR</b>	- kvantitativna magnetska rezonanca
<b>QUI</b>	- indeks kvantitativnog ultrazvuka (engl. Quantitative Ultrasound Indeks)
<b>QUZV</b>	- kvantitativni ultrazvuk
<b>RANK</b>	- (engl. Receptor Activator of Nuclear factor KB)
<b>RANKL</b>	- (engl. Receptor Activator of Nuclear factor KB Ligand)
<b>rhTSH</b>	- rekombinantni humani TSH
<b>RIA</b>	- radioimunoesej
<b>RVT</b>	- tromboza retinalnih vena
<b>SD</b>	- standardna devijacija
<b>SEM</b>	- srednja standardna pogreška
<b>SMI</b>	- indeks strukturalnog modela
<b>SOS</b>	- brzina ultrazvučnog vala (engl. Speed Of Sound)
<b>SS</b>	- somatostatin
<b>SZO</b>	- Svjetska zdravstvena organizacija
<b>T3</b>	- trijodtironin
<b>T4</b>	- tiroksin
<b>Tb. N</b>	- broj trabekula
<b>Tb. Sp</b>	- trabekularni razmak
<b>Tb. Th</b>	- debljina trabekula
<b>TBG</b>	- globulin koji veže tiroksin (engl. Thyroxin Binding Globulin)
<b>TBPf</b>	- činitelj oblika trabekularne kosti (engl. Trabecular Bone Patern factor)
<b>TGF-β</b>	- transformirajući čimbenik rasta beta (engl. Transforming Growth Factor-beta)
<b>Th-L</b>	- Grudne i slabinske (torako-lumbalne)
<b>TNF-α</b>	- faktor nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor alfa)
<b>TRH</b>	- hormon koji oslobađa TSH (engl. Thyreotropin Releasing Hormone)

<b>TRs</b>	-	Receptori za hormone štitnjače (engl. Thyroid Receptors)
<b>TR<math>\alpha_1</math></b>	-	receptor hormona štitnjače alfa1
<b>TR<math>\beta</math></b>	-	receptor hormona štitnjače beta
<b>T-sc.</b>	-	T-vrijednost
<b>TSH</b>	-	hormon koji stimulira štitnjaču (engl. Thyreotropin Stimulating Hormone)
<b>TSH-R</b>	-	TSH receptor
<b>TT</b>	-	Tjelesna težina
<b>TTR</b>	-	transtiretin
<b>TV</b>	-	Tjelesna visina
<b>UZV</b>	-	ultrazvuk
<b>VEGF</b>	-	Faktor rasta endotela krvnih žila (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)
<b>VFA</b>	-	postranično DXA slikanje kralježnice (engl. Vertebral Fracture Assessment)
<b>X</b>	-	srednja vrijednost
<b>Z-sc.</b>	-	Z-vrijednost



## SADRŽAJ

Popis oznaka i skraćenica .....	1
1. UVOD .....	8
1.1. TSH i štitna žlijezda .....	9
1.2. Definicija i značaj osteoporoze .....	13
1.3. Epidemiologija osteoporoze .....	15
1.3.1. Epidemiologija osteoporoze u Hrvatskoj .....	17
1.4. Patogeneza osteoporoze .....	18
1.4.1. Mehanizmi nastanka osteoporoze .....	18
1.4.2. Determinante vršne koštane mase .....	20
1.4.3. Mehanizmi gubitka koštane mase .....	22
1.4.4. Uloga sistemskih hormona .....	26
1.4.5. Uloga lokalnih citokina i prostaglandina .....	29
1.4.6. Uloga lokalnih čimbenika rasta .....	31
1.5. Dijagnostika osteoporoze .....	32
1.6. Komplikacije osteoporoze .....	36
1.7. TSH i osteoporoza .....	39
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	45
3. HIPOTEZE .....	46
4. MATERIJAL I METODE .....	47
4.1. Učinak cikličke primjene humanog TSH u sprječavanju gubitka kosti u pokusima na životinjama.....	47
4.2. Određivanje serumskih vrijednosti TSH i BMD u postmenopauzalnih pacijentica s osteoporozom i prijelomom kralježka .....	51

4.3. Određivanje učinkovitosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje i periferne hormone štitnjače u postmenopauzalnih žena .....	55
4.3.1. Praćenje sekvencijskih promjena TSH i biljega koštane pregradnje u bolesnica s odstranjenom štitnjačom (protokoli C1 i C2).....	59
4.3.2. Učinak jednokratne stimulacije endogenog TSH pomoću tireotropnog hormona (TRH) na biljege koštane pregradnje u bolesnica s postmenopauzalnom osteoporozom .....	62
5. REZULTATI .....	65
5.1. Učinak cikličke primjene humanog TSH u sprječavanju gubitka kosti u pokusima na životinjama.....	65
5.2. Određivanje korelacije serumskih vrijednosti TSH s BMD u postmeno-pauzalnih pacijentica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti .....	80
5.3. Određivanje korelacije serumskih vrijednosti TSH s učestalosti prijeloma kralježaka u postmenopauzalnih pacijentica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti .....	94
5.4. Učinak djelovanja endogenog TSH na hormone štitnjače i biljege koštane pregradnje u postmenopauzalnih žena .....	103
5.4.1. Učinak postepenog porasta suprimiranih vrijednosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje nakon prekida tireo-supresivnog HNL levotiroksinom u pacijentica s odstranjenom štitnom žlijezdom zbog karcinoma štitnjače (protokol C1) .....	103

5.4.2. Učinak postepenog smanjenja visokih vrijednosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje u pacijentica nakon operativnog odstranjenja štitnjače i neuzimanja HNL levotiroksinom tijekom 28 dana (protokol C2).....	115
5.4.3. Učinak jednokratne stimulacije endogenog TSH pomoću tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH) na TSH, hormone štitnjače, biljege koštane pregradnje i druge metaboličke parametre u pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom (protokol C3) .....	126
6. RASPRAVA .....	138
6.1. Pretklinička istraživanja .....	140
6.2. Epidemiološko istraživanje .....	141
6.3. Uloga endogenog TSH .....	145
7. ZAKLJUČCI .....	149
8. SAŽETAK .....	151
9. SUMMARY .....	153
10. LITERATURA .....	155
11. ŽIVOTOPIS .....	174
12. PRILOZI .....	176

## 1. UVOD

Osteoporoza i poremećaji funkcije štitnjače česta su bolest u starijih, a von Recklinghausen je još prije 100 godina prepoznao da hipertireoza može uzrokovati osteoporozu. U 8-13% žena starijih od 50 godina nalazimo biokemijske znakove poremećene funkcije štitnjače (1), a 30% žena ima osteoporozu prema denzitometrijskom (DXA; dvoenergetska apsorpciometrija X zraka) mjerenju mineralne gustoće kosti (2). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) osteoporoza predstavlja veliki društveno-ekonomski i javno-zdravstveni problem obzirom da zahvaća 8-10% populacije, a u najrazvijenijim zemljama svijeta liječi se samo 10-20% bolesnika. Velika su nepoznanica međuodnos osteoporoze i bolesti štitnjače, odnosno hormonske supstitucije štitnjače. Učestalost ova dva medicinska problema traže objašnjenje i veliki su izazov za razumijevanje učinka hormona štitnjače na kost.

S druge strane središnja endokrina žlijezda, hipofiza, pravi je dirigent u orkestru endokrinih žlijezda. Njen utjecaj na kost je od vitalne važnosti za postizanje i održavanje vršne koštane mase obzirom da svaki od hormona izravno ili posredno utječe na koštanu masu. Najvažnija uloga se pripisuje gonadotropnim hormonima, a gubitak estrogena u kasnijoj generativnoj dobi, kao i u menopauzi, dovodi do povećanja koštane resorpcije uzrokovane povećanim lučenjem osteoklastogenih citokina i posljedično brzog gubitka koštane mase. Nadoknadom estrogenih hormona najčešće smo u mogućnosti značajno popraviti koštanu masu što potvrđuje njihovu etiopatogenetsku važnost. Hormon rasta ima anabolički učinak na kost stoga akromegalija ne pogoršava koštanu masu niti povećava rizik od prijeloma, osim ako nije udružena s hipogonadizmom, što je vrlo često (3). Prolaktinom je najčešći tumor hipofize koji visokim prolaktinom djeluje izravno inhibirajuće na gonadalnu funkciju i posredno dovodi do osteoporoze. Endogeni hiperkortizolizam (npr. kortikotropinom), slično kao terapijska primjena glukokortikoida, imaju jaki katabolički učinak na kost s razvojem brzo progresivne teške osteoporoze. Negativno djelovanje suviška endogenih ili egzogenih hormona štitnjače na koštanu masu očituje se izraženijim povećanjem osteoklastičke u odnosu na osteoblastičku aktivnost. Hormon koji stimulira štitnjaču (TSH; thyreotropin stimulating hormone) jedan je od hormona prednjeg režnja hipofize za koji postoje spoznaje da bi mogao izravno djelovati na koštanu masu.

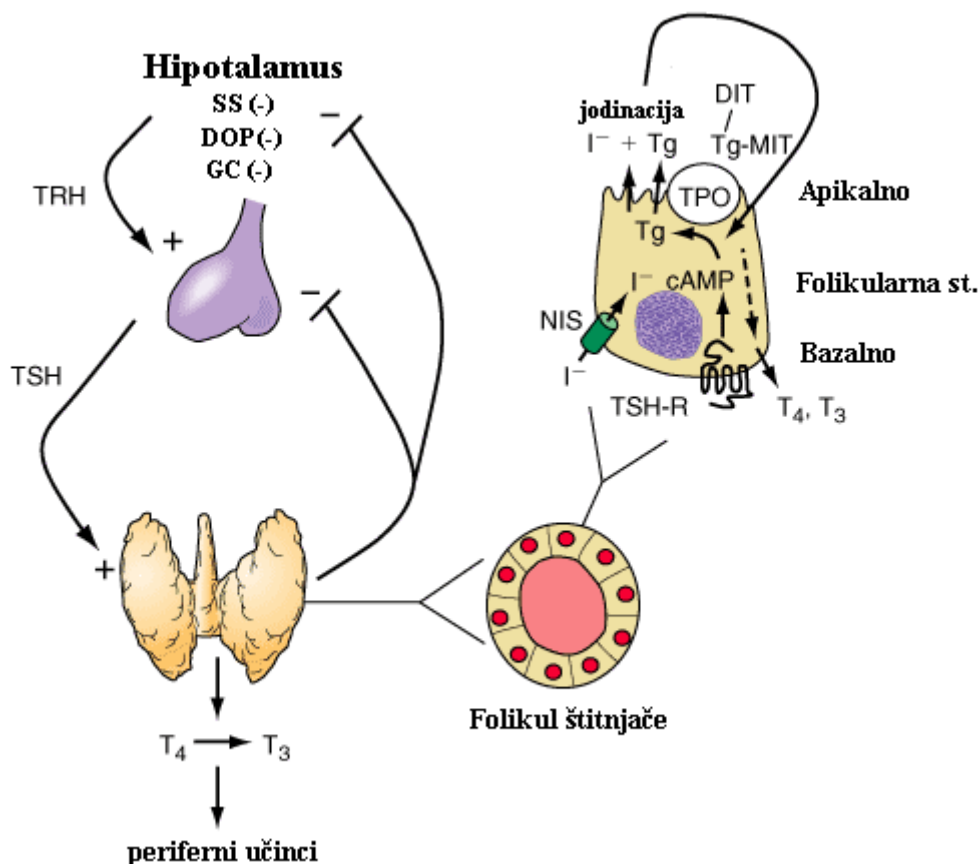
## 1.1. TSH i štitna žlijezda

Glavni kontrolni čimbenik funkcije štitnjače je serumska razina TSH. Uvriježeno je mišljenje da TSH isključivo djeluje putem osi hipotalamus-hipofiza-štitnjača na hipertrofiju/hiperplaziju folikularnih stanica štitnjače te na pojačano lučenje i stvaranje hormona štitnjače (4, 5). Humani TSH ili tiotropin je glikoprotein s molekularnom masom oko 31.000 daltona, sintetiziran u bazofilnim stanicama (tireotropne stanice) koje čine 5% stanica prednjeg režnja hipofize (6). Ljudski TSH se sastoji od dvije nekovalentnom vezom povezane podjedinice nazvane alfa i beta. Alfa podjedinica (89 AK) jednaka je obitelji glikoproteinskih hormona u koje spadaju luteinizirajući hormon (LH), folikul stimulirajući hormon (FSH) i humani horionski gonadotropin (hCG), a beta podjedinica (112 AK) je hormon specifična i predstavlja biološku i imunološku specifičnost pojedinog hormona. Obje podjedinice, alfa i beta, su odgovorne za biološku aktivnost (7). Vežanje TSH za membranski receptor (TSH-R; sedam transmembranski glikozilirani G-protein vezan receptor) stanica štitnjače aktivira sustav G-proteina koji vežu gvaninske nukleotide, a osim u štitnjači nalaze se u mnogim tkivima. G-protein disocira u podjedinice  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podražavajući efektor tj. adenilciklazu, što dovodi do stvaranja cAMP iz ATP. Ciklički AMP aktivira proteinske kinaze koji uzrokuju fosforilaciju različitih proteina. TSH također stimulira promjenu fosfatidilinozitola aktiviranjem fosfolipaze C. Stimulacija štitnjače s TSH povećava unos joda i transport koloida u stanicu, stimulira stvaranje i izlučivanje metabolički aktivnih hormona štitnjače, tiroksina (T4) i trijodtironina (T3) (slika 1.1.) (8). TSH se luči pulsno i pokazuje dnevni ritam, ali nešto umjerenije u odnosu na druge hormone hipofize obzirom na nisku amplitudu pulsa i relativno dulje poluvrijeme raspada TSH (50 min). Određena vrijednost TSH može varirati o ciklusu lučenja, a najveće vrijednosti TSH u serumu nalazimo u večernjim satima (6).

Hormoni štitnjače su odgovorni za regulaciju različitih biokemijskih procesa u tijelu koji su neophodni za normalnu diferencijaciju tijekom rasta i razvoja, te pomažu u održavanju toplinske i metaboličke homeostaze. Regulacija lučenja hormona štitnjače u osi hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda klasični je primjer hormonske povratne sprege. Stvaranje i izlučivanje TSH stimulirano je hormonom koji oslobađa TSH (TRH; thyreotropin releasing hormone), hipotalamičkim tripeptidom (pyro-Glu-His-Pro-NH<sub>2</sub>; piroglutamil-histidil-prolinamid) relativno malog poluvremena raspada (4 min), kao reakcija na smanjene perifernih hormona štitnjače u cirkulaciji što je prikazano na slici 1.1. (9, 10). U slučaju visokih vrijednosti T3 i

T4 smanjuje se stvaranje TSH putem klasične negativne povratne sprege, slabije na hipofizu (TSH) i mnogo značajnije na hipotalamus (TRH), stoga su hormoni štitnjače dominantni regulator lučenja TSH. Novije spoznaje potvrđuju da somatostatin (SS), dopamin (DOP) i glukokortikoidi (GC) imaju inhibicijski učinak na TSH, tako hipotalamus ima stimulacijski i inhibicijski učinak na lučenje TSH u prednjem režnju hipofize (11).

**Slika 1.1.** Prikazuje mehanizam kontrole lučenja hormona štitnjače putem osovine hipotalamus -hipofiza-štitna žlijezda i stvaranje hormona štitnjače u folikularnim stanicama (TSH - tireotropin; TRH - TSH oslobađajući hormon; T3 - trijodtironin; T4 - tiroksin; SS - somatostatin; DOP - dopamin; GC - glukokortikoidi; TSH-R - TSH receptor; Tg - tireoglobulin; cAMP - ciklički adenozin monofosfat; J - jod; NIS -NaJ simporter; TPO - tireoidna peroksidaza; DIT - dijodtirozin, MIT - monojodtirozin).



Poremećaj na bilo kojem nivou u regulaciji hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda dovesti će do smanjenog (hipotireoza) ili pojačanog (hipertireoza) lučenja hormona štitnjače. U slučajevima primarnog hipotireoidizma vrijednosti T3 i T4 su niske, a TSH je značajno porastao (12). U slučaju poremećaja funkcije hipofize, uzrokovanog bolesti hipotalamusa ili hipofize, kao npr. u centralnom hipotireoidizmu, normalne ili granično visoke vrijednosti TSH se nalaze usprkos značajnom smanjenju lučenja hormona štitnjače. Rutinski test stimulacije s TRH u ovim slučajevima potvrđuje dijagnozu. U slučaju sekundarnog hipotireoidizma na TRH test nema odgovora TSH, dok u tercijarnom hipotireoidizmu TSH odgovor u TRH test može biti uredan, produžen ili pojačan (13, 14, 15). U nekim slučajevima, kao što je hormonski aktivni tumor tireotropnih stanica hipofize (tireotropinom), visoki TSH ne znači hipotireozu već je rezultat autonomnog lučenja TSH secernirajućeg tumora prednjeg režnja hipofize (sekundarni hipertireoidizam) s posljedičnom kliničkom hipertireozom u tih pacijenata (16, 17). Primarni hipertireoidizam (npr. Mb. Basedow, adenom štitnjače ili nodozna struma) je obilježen visokim razinama hormona štitnjače u cirkulaciji i suprimiranim ili nemjerljivim serumskim TSH (18). TRH stimulacijski test u dozi 200 µg intravenski (i.v.), u normalnim uvjetima, dovodi do porasta TSH već za 15 minuta bar 2-3 puta u odnosu na bazalnu vrijednost, dok je porast prolaktina nešto kasnije (30-60 min) bar 3-5 puta u odnosu na bazalnu vrijednost. TRH test u pacijenata s hipertireozom pokazuje slab (subnormalan) odgovor TSH (19). Također, visoke doze glukokortikoida, somatostatina, dopamina i supstitucijska terapija hormonima štitnjače smanjuju ili potpuno onemogućavaju porast (odgovor) TSH u TRH testu (19, 20). Raniji testovi za određivanje TSH bili su slabije osjetljivosti te nisu mogli dijagnosticirati hipertireozu stoga se nisu mogli koristiti kao primarni test (21). Danas se uglavnom koriste vrlo osjetljivi TSH testovi (ultrasensitive), kojima smo u mogućnosti jasno razlikovati eutireozu od hipertireoze, isključena je potreba za funkcionalnim testovima štitnjače, a TSH se koristi kao vrlo pouzdan parametar funkcije štitnjače u kliničkoj medicini što je značajno unaprijedilo dijagnostičke mogućnosti u bolestima štitnjače (22, 23). Normalne vrijednosti serumskog TSH tako isključuju primarnu bolest štitnjače (24). Vrlo osjetljivi testovi za mjerenje TSH (IV generacije), mogu izmjeriti TSH vrijednost od 0,004 mIU/L, no za praktičnu primjenu dovoljna je osjetljivost od 0,1 mIU/L. Ukoliko je TSH vrijednost izvan očekivanog raspona potrebno je mjeriti periferne (cirkulirajuće) hormone štitnjače da se potvrdi hipertireoza ili hipotireoza. Opće prihvaćenom radioimunoesej metodom (RIA) u mogućnosti smo mjeriti koncentraciju ukupnog T3 i T4, vezane u visokom postotku za proteine plazme na koje mogu utjecati različite bolesti, lijekovi ili genetski čimbenici. Zahvaljujući vrlo visokom afinitetu oko 80% hormona štitnjače (T3 i

T4) u plazmi je vezano na globulin koji veže tiroksin (TBG; thyroxin binding globulin), albumin ima relativno slab afinitet no u vrlo je visokoj koncentraciji u plazmi te veže 10% T4 i 30% T3, dok transtiretin (TTR) nosi oko 10% T4 i vrlo malo T3 (25). Ukupni hormoni štitnjače su povišeni u slučajevima visokog TBG-a, npr. zbog estrogena (trudnoća, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija - HNL, tamoksifen), a sniženi su u slučajevima smanjenog TBG-a (androgeni, nefrotski sindrom). Genetski poremećaji, akutne bolesti i različiti lijekovi (fenitoin, karbamazepin, salicilati i nesteroidni antireumatici) mogu utjecati na koncentraciju TBG-a. Stoga je korisnije, ali skuplje mjeriti vrlo male slobodne frakcije tj. FT3 (0,3%) i FT4 (0,02%), koje su izraz biološke aktivnosti hormona štitnjače (25).

Karcinomi štitnjače najčešće su zloćudne novotvorine u endokrinom sustavu, a nastaju iz folikularnog epitela i klasificiraju se prema histološkim osobinama. Diferencirani tumori, kao papilarni karcinom ili folikularni karcinom štitnjače često su izlječivi, s dobrom prognozom u ranom stadiju otkrivanja. Anaplastički karcinomi štitnjače su agresivni, slabog terapijskog odgovora i s lošijom prognozom. Otkrije se tek 9 slučajeva na 100.000 stanovnika godišnje, dijagnoza je u stalnom porastu, ali ne i smrtnost što odražava prirodni tijek bolesti i poboljšanu dijagnostiku. Folikularni karcinomi se javljaju u srednjoj i starijoj, anaplastički u starijoj, a papilarni i medularni karcinom u svakoj životnoj dobi. Žene oboljevaju dva puta češće, ali muškarci imaju lošiju prognozu bolesti. Klinička slika u većine tumora je dugo asimptomatska, obično se javi čvor na vratu ili povećanje štitnjače, a rijetko hormonska aktivnost tumora ukazuje na bolest. Liječenje se sastoji u potpunom odstranjivanju tumora tj. totalnoj tireoidektomiji, a u slučaju proširenosti tumora i radikalnoj resekciji vrata (26). Nakon 3-4 tjedna, kada TSH poraste na više od 50 mIU/L bolesnik se upućuje na scintigrafiju cijelog tijela pomoću radioaktivno obilježenog joda ( $J^{131}$ ) kako bi se otkrili ostaci štitnjače ili presadnice. U slučaju pozitivnog nalaza daje se terapijska doza  $J^{131}$ , a nakon toga doživotno se suprimira TSH levotiroksinom (tiresupresivna terapija). To sprječava rast papilarnog i folikularnog, a katkad i medularnog karcinom, te liječi hipotireozu. Scintigrafija i određivanje tireoglobulina se, kontrole radi, ponavljaju za 6 mjeseci, a potom svakih godinu dana. Prije scintigrafije se može dati rekombinantni humani TSH (rhTSH), ali nalazi nisu tako pouzdani kao nakon klasičnog izostavljanja tiresupresivne terapije. Supresijom TSH postiže se terapijska korist, no nema prospektivnih studija koje su potvrdile optimalnu, supresivnu razinu TSH. Razumni cilj je postići supresiju TSH, bez kliničke slike hipertireoze s komplikacijama kao što su fibrilacija atriya, osteopenija, anksioznost ili drugi simptomi tireotoksikoze. Za pacijente s niskim rizikom recidiva ciljna terapija supresije TSH bi iznosila



0,1 do 0,5 mIU/L. Za one s visokim rizikom, ili poznatim presadnicama, indicirana je potpuna supresija TSH do blage tireotoksikoze. U takvim slučajevima kontrola FT4 osigurava od prekomjerne supresije (26).

## 1.2. Definicija i značaj osteoporoze

Osteoporoza, najčešća metabolička bolest kosti, sistemska je bolest skeleta obilježena smanjenom masom koštanog tkiva i poremećenom mikroarhitekturom koštanih gredica s posljedično povećanim rizikom od prijeloma što je uzrok morbiditeta i mortaliteta, osobito u starijoj populaciji (27). Osteoporoza je jedan od najvažnijih javno-zdravstvenih i društveno-ekonomskih problema razvijenog svijeta. To je bolest starije dobi, značajno češća u ženskoj populaciji, osobito važna zbog visoke prevalencije koštanih prijeloma i troškova liječenja. Godišnje se u SAD-u dogodi 1,3 mil. osteoporotičnih prijeloma, od kojih je polovina u području kralježnice, četvrtina u području vrata bedrene kosti i četvrtina u području podlaktice, a najčešće (15-20%) umiru bolesnici s prijelomom vrata bedrene kosti i zdjelice još u prvoj godini po prijelomu (28). Žene u premenopauzi imaju značajno manji rizik od osteoporotičnog prijeloma, stoga za njih nije dovoljno samo izmjeriti mineralnu gustoću kosti. Zbog velike učestalosti u populaciji i uglavnom neprepoznate kliničke slike (50% bolesnika s osteoporozom nema kliničkih smetnji, bez osobitih simptoma, koji bi se mogli povezati s osteoporozom) vrlo često se naziva „tihom epidemijom“ modernog doba, a u najrazvijenijim zemljama svijeta liječi se samo 10-20% bolesnika. SZO je 1993. godine definirala osteoporozu mjerenjem mineralne gustoće kosti (BMD; bone mineral density) pomoću DXA aparata u postmenopauzalnih žena koja je 2,5 standardne devijacije (SD) ili manje od izmjerene u prosječnoj mladoj odrasloj populaciji u području kralježnice, vratu bedrene kosti ili podlaktici. Za manji gubitak koštane gustoće, tj. rezultatima DXA mjerenja mineralne gustoće kosti koji odgovaraju od -1 do -2,5 SD za mladu odraslu populaciju, postavlja se dijagnoza osteopenije. Godinu dana kasnije su navedeni kriteriji dopunjeni postojanjem „osteoporotičnog prijeloma“, usprkos DXA nalazu, što već znači uznapredovalu tj. tešku osteoporozu (Tablica 1.1.) (29). Zbog često lažno pozitivnih DXA nalaza podlaktice u starijoj populaciji sve se više isključuje kao dijagnostički kriterij.

**Tablica 1.1.** Prikazuje dijagnostičke kriterije za osteoporozu prema SZO-u.

<b>Dijagnoza</b>	<b>DXA kriterij</b>
<b>Uredan nalaz</b>	BMD ne niži od 1 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju
<b>Osteopenija</b>	BMD između -1 i -2.5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju
<b>Osteoporoz</b>	BMD niže od -2.5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju
<b>Teška osteoporoz</b>	BMD niže od -2.5 SD prosjeka za mladu odraslu populaciju uz postojanje jednog ili više osteoporotičnih prijeloma

Najčešća je postmenopauzalna osteoporoz kao posljedica gubitka estrogena, a senilna osteoporoz nastaje u starijoj životnoj dobi prvenstveno kao posljedica nedovoljnog uzimanja kalcija i/ili nedostatka vitamina D. Sekundarna osteoporoz posljedica je drugih bolesti kao što su hiperkortizolizam, hiperparatireoidizam, hipertireoz, malnutricija i sl. Naziv idiopatska osteoporoz najčešće se koristi u slučajevima osteoporoze mlade životne dobi nepoznatog uzroka (30). Smanjenje koštane mase znači da kost postaje „porozna“, sadržaj minerala po gramu koštanog tkiva je smanjen. Smanjenje mase ne prati značajno smanjenje omjera mineralne prema organskoj supstanci niti poremećaj mineralnog ili organskog matriksa kosti. Histološki dolazi do stanjenja kortikalnog dijela kosti, smanjenja broja i veličine gredica spužvaste kosti koje su tanje i često prelomljene, najprije horizontalne, a potom i vertikalne, stoga im se gubi povezanost koja bitno utječe na čvrstoću kosti (27). Najvažnija komplikacija osteoporoze je prijelom kosti koji nastaje kao rezultat minimalne traume (low trauma fracture) u porotičnoj kosti i naziva se osteoporotični prijelom. To se smatra prijelomom u odrasle osobe koji nastaje padom sa stojeće visine ili niže, bez značajnije traume koja bi mogla opravdati prijelom, a najčešće se događa u području grudne i slabinske kralježnice, vratu bedrene kosti i podlaktici. Koštana masa se izgrađuje u djetinjstvu i mladosti, tj. do tridesetih godina života kada postiže svoj maksimum, a potom se smanjuje prema odmakloj životnoj dobi, značajno više u žena nego muškaraca. Naime tijekom života kost se neprekidno pregrađuje, razgrađuje se stara i manje vrijedna koštana struktura, oštećena mikroprijelomima,

a zamjenjuje novom i otpornijom, osobito važno na mjestima pojačanog naprezanja (31). Razgradnja i izgradnja kosti dva su međusobno vrlo povezana procesa, tako da ubranu razgradnju prati i ubrzana izgradnja kosti i obratno, usporenu razgradnju prati i usporena izgradnja koštane strukture. Površine kosti koja se razgrađuje prekrivene su aktivnim osteoklastima, stanicama zaduženim za razgradnju kosti; dok su površine izgradnje odnosno stvaranja kosti prekrivene osteoidom i aktivnim osteoblastima tj. stanicama zaduženim za stvaranje nove kosti.

### 1.3. Epidemiologija osteoporoze

Prema SZO-u osteoporoza predstavlja jedan od vodećih društveno-ekonomskih i javno-zdravstvenih problema u razvijenim zemljama svijeta, nakon kardiovaskularnih bolesti i tumora, s tendencijom rasta, sukladno porastu dobne strukture populacije (32). Prema kriterijima SZO-a (T-sc.  $<-2.5$ ) smatra se da 15% stanovništva bijele rase starijeg od 50 godina i čak 70% starijeg od 80 godina ima osteoporozu (33). Prema istom istraživanju, 10.3% ukupnog stanovništva SAD-a ima osteoporozu. Čak 30% bijelih žena u postmenopauzi ima osteoporozu, a 54% osteopeniju (34). Najučestalija je postmenopauzalna osteoporoza, stoga je ženski spol važan rizik za osteoporozu, iako jedna trećina bolesnika s osteoporozom su muškarci. Gubitak estrogena u menopauzi je najvažniji uzročni čimbenik. Žene u dobi iznad 50 godina imaju tri puta veći rizik doživjeti prijelom kralježka ili vrata bedrene kosti u odnosu na muškarce (16 i 18 % u odnosu na 5 i 6%) i šest puta veći rizik prijeloma podlaktice (16 prema 2,5%) (2).

Porast životne dobi jedan je od najvećih rizika za osteoporozu. Niska mineralna gustoća kosti i osteoporotični prijelomi vrlo su rijetki u premenopauzalnih žena, uglavnom se tada radi o sekundarnim uzrocima osteoporoze (gubitak estrogena, hiperkortizolizam, hiperparatireoidizam i sl.). SZO je izmjerila prevalenciju osteoporoze u zapadnim razvijenim zemljama prema dobnim skupinama u ženskoj populaciji, uzimajući u obzir sva područja mjerenja, i dobila 14.8% žena s osteoporozom u dobi 50-59 godina, 21.6% za dob 60-69 godina, 38.5% za dob 70-79 godina, te čak 70% u žena dobi 80 godina i starije (29).

Veća učestalost osteoporoze nađena je u stanovništvu azijskih zemalja, dok je u Australiji učestalost manja u odnosu na europsko i sjeverno-američko bijelo stanovništvo. Niska mineralna gustoća kosti najvažniji je prediktor prijeloma u svim etničkim grupama (35, 36). Prosječna mineralna gustoća kosti u azijskih žena je manja nego u bjelkinja zbog slabije

konstitucijske građe tijela. U studiji od 2.300 premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena tjelesne težine manje od 70 kg, prilagođeno prema svim čimbenicima koji mogu utjecati na BMD, slična je gustoća kosti u afričko-američkih, japanskih i kineskih žena, dok su bjelkinje imale niži BMD (37). 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% (38).

Nekoliko različitih čimbenika utječe na pojavu osteoporoze u zadnjih 10-tak godina. Čovječanstvo je demografski sve brojnije i starije, očekivano trajanje života se unatrag 100 godina povećalo za više od 50%. Medicina je naprednija, a populacija je zdravija stoga se udvostručio broj starijih i smanjio udio mladih, a učestalost osteoporoze progresivno raste s dobi. Napredak tehnike omogućio je rano otkrivanje osteoporoze, prije pojave simptoma ili komplikacija bolesti. Sve je veći broj uređaja koji mogu brzo, jednostavno i precizno izmjeriti mineralnu gustoću kosti, procijeniti rizik od prijeloma, a ranim liječenjem mogu se prevenirati komplikacije tj. prijelomi i invalidnost. Povećanje dobne strukture populacije i način života u slijedećih 50 godina udvostručiti će broj bolesnika, a potvrđene su spoznaje o neadekvatnoj zbrinutosti bolesti, iako potrošnja nacionalnih fondova za liječenje osteoporoze i njenih komplikacija bilježi veliki rast. Bolest zahvaća oba spola, iako ne podjednako učestalošću; 40% žena i 13% muškaraca starijih od 50 godina doživjeti će barem jedan klinički značajan osteoporotični prijelom (2). Učestalost osteoporotičnih prijeloma u muškaraca je značajno manja nego u žena zbog nekoliko razloga. U muškaraca je veći periostalni rast kosti što rezultira smanjenjem opterećenja po jedinici površine, pa je kost manje podložna prijelomu. Muškarci tijekom života sporije i manje gube koštanu masu, u svakoj dobi muškarci imaju 20-30% veći BMD od žena, a veći BMD nosi sa sobom i određene mehaničke prednosti skeleta muškaraca. Podaci o prevalenciji osteoporoze nisu jednoznačni i ovise o mjestu mjerenja (slabinska kralježnica, vrat bedrene kosti i podlaktica) i prihvaćenoj definiciji osteoporoze. Rezultati istraživanja u Rochesteru (Minnesota), su pokazali da 13,6% žena i 15,8% muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu kada se za dijagnozu koristi kriterij T-sc.  $\leq 2,5$  u području vrata bedrene kosti. No, ukoliko osteoporozu definiramo prema SZO, kao T-sc.  $\leq -2,5$  u bilo kojoj od mjerenih regija (slabinska kralježnica, vrat bedrene kosti ili podlaktica), 34,7% žena i 19,4% muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu (38). S druge strane, prema podacima s trećeg NHANES-a (National Health and Nutrition Examination Survey) 4% muškaraca bijele rase, starijih od 50 godina, ima osteoporozu vrata bedrene kosti (39).

### 1.3.1. Epidemiologija osteoporoze u Hrvatskoj

U Hrvatskoj, nažalost, ne postoji jedinstveni zdravstveni sustav registriranja i praćenja oboljelih od osteoporoze, no ipak, nekoliko epidemioloških istraživanja daju dobar uvid u učestalost osteoporoze i prijeloma u našoj zemlji, a korelacija s epidemiološkim podacima i prevalencijom u razvijenim zemljama svijeta to potvrđuje. Prema epidemiološkim podacima razvijenog svijeta i u odnosu na dobnu strukturu te popis stanovništva iz 2001.g. u Hrvatskoj se očekuje 200.000 bolesnika s osteoporozom i 400.000 bolesnika s osteopenijom, od kojih su 2/3 žene, a 1/3 muškarci (40). U Hrvatskoj se godišnje troši oko 80 milijuna kuna za lijekove u bolesnika s osteoporozom, s tendencijom porasta 20-30% godišnje, a da pritom Ministarstvo zdravstva nema sredstva niti planove za prevenciju i rano otkrivanje bolesti, kao niti za edukaciju i prosvjeđivanje pučanstva. Hrvatsko društvo za osteoporozu i Hrvatsko društvo za kalcificirana tkiva neprofitne su udruge i organizacije s međunarodnim značajem, koje ulažu velike napore u edukaciju pučanstva, rano otkrivanje i prevenciju osteoporoze putem različitih sponzoriranih programa. Hrvatsko društvo za osteoporozu od travnja 1999. u Hrvatskoj provodi ultrazvučno (UZV) mjerenje mineralne gustoće petne kosti u rizičnoj populaciji (82,6% starijih od 50 godina; 93,1% ženska populacija i 80,4% ispitanica u menopauzi) na 14.324 ispitanika, prema podacima do veljače 2007. godine. Jednostavnom metodom korelacije UZV nalaza gustoće petne kosti, temeljenoj na referentnim skupinama proizvođača u odnosu na spol, dobnu skupinu i područje mjerenja, izračunava se ekvivalentna DXA T-vrijednost za kralježnicu i vrat bedrene kosti. Samo 16,8% ispitanika imalo je uredan nalaz, u 45% se nalazi osteopenija, a u 38,2% mjerenja potvrđena je osteoporoza (41). Vrlo slični podaci su dobiveni ispitivanjem učestalosti osteoporoze prema mjerenjima DXA aparatom (Delphia, Hologic, SAD) u Centru za osteoporozu Kliničkog bolničkog centra Zagreb od 2002. do 2004. godine. Izdvajanjem samo prvih mjerenja na 10.308 pacijenata, prosječne dobi 60,2 godine, nalazi se 31,5% pacijenata s osteoporozom, odnosno 45,8 s osteopenijom i 22,7% pacijenata s urednim DXA nalazom (40). Multicentrično istraživanje provedeno na 6.000 ispitanika u dobi od 20 do 79 godina iz 13 zemalja nije pokazala značajnije razlike u koštanoj masi između ispitanika iz Hrvatske i drugih europskih zemalja (42, 43). Usporedba između spolova pokazala je da su muškarci, nakon korekcije za visinu i težinu, imali veću koštanu masu u području bedrene kosti, a žene u kralježnici (44). Prve procjene o učestalosti osteoporoze u muškoj populaciji Hrvatske dali su rezultati ECUM (Epidemiology of Calcaneus Ultrasound in Males) studije (45). Multicentrična studija ispitivanja mineralne gustoće petne kosti UZV-om na 1.002 muškarca u dobi 20-99 godina pokazala je da 16,2%

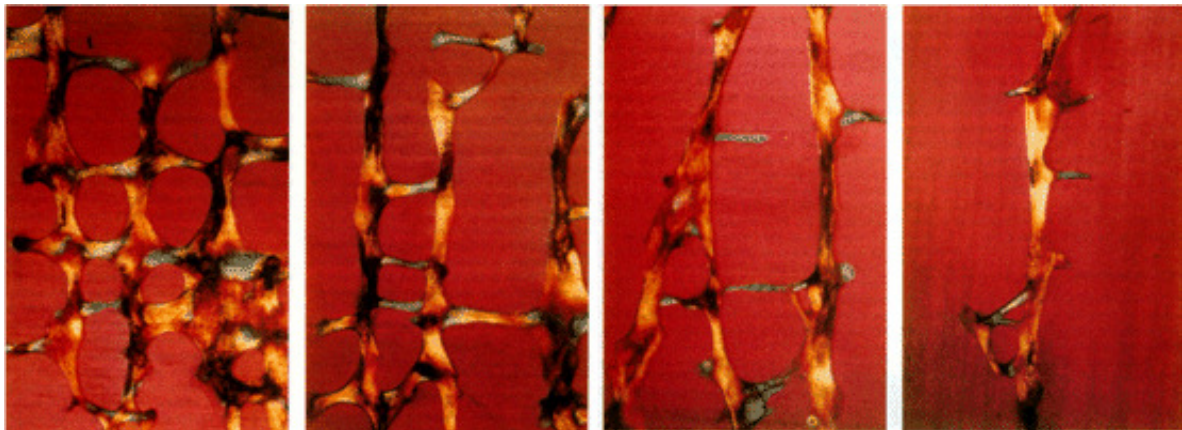
muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu. Istom dijagnostičkom metodom utvrđeno je da 28,2% žena starijih od 50 godina ima osteoporozu (neobjavljeni podaci). Usporedbom vrijednosti ultrazvučnih parametara kosti između muškaraca i žena po dobnim skupinama nađena je značajno niža vrijednost brzine ultrazvučnog vala (SOS), slabljenja ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (BUA) i indeksa kvantitativnog ultrazvuka (QUI) u žena starijih od 60 godina u odnosu na muškarce iste dobi što je povezano s ubrzanom pregradnjom kosti i gubitkom koštane mase u žena nakon menopauze (neobjavljeni podaci).

## 1.4. Patogeneza osteoporoze

### 1.4.1. Mehanizmi nastanka osteoporoze

Prema definiciji osteoporoza je sistemska bolest skeleta karakterizirana smanjenom koštanom masom i poremećajem mikroarhitekture koštanih gredica, što uzrokuje slabost kosti i povećani rizik od prijeloma (Slika 1.2.) (46).

Slika 1.2. Prikazuje postepeni gubitak koštane mase koji se očituje u stanjenju i gubitku koštanih gredica, osobito horizontalnih, s posljedičnim poremećajem mikroarhitekture i povećanom lomljivosti kosti !



Niska koštana masa je karakteristično i lako mjerljivo obilježje osteoporoze stoga SZO dijagnozu temelji na vrijednosti mineralne gustoće kosti (BMD) koja je za 2,5 SD niža od prosječne u mladoj odrasloj populaciji zdravih žena. Koštani matriks osteoporotične kosti je normalno mineraliziran, što je razlikuje od slabo mineralizirane kosti u osteomalaciji.

Mikroarhitektura kosti održava koštanu čvrstoću, a njen poremećaj narušava integritet strukture kosti i dovodi do povećane lomljivosti, uzrokovano neovisno ubrzanom pregradnjom kosti i rizičnim čimbenicima (47). Drugi čimbenici mogu biti mikrofrakture i „zamor“ kosti, porast rupa i prekinutih koštanih gredica, osobito gubitak horizontalnih gredica, promjene u makroarhitekturi kosti (npr. veća duljina uzrokuje veći rizik prijeloma), položaju, snazi mišića, učestalosti i načinu padova (48). Niska koštana masa može biti posljedica smanjene izgradnje kosti tijekom djetinjstva i puberteta (niska vršna koštana masa) ili u kasnijoj dobi povećanog gubitka koštane mase.

Niska koštana masa u kasnijoj životnoj dobi može biti posljedica niske vršne koštane mase, ubrzane koštane pregradnje i neravnoteže između funkcije osteoblasta (izgradnje) i osteoklasta (razgradnje). Proces koštane pregradnje uvijek započinje razgradnjom kosti koju potom slijedi koštana izgradnja. Za jedan ciklus pregradnje kosti potrebno je do 8 mjeseci, s tim da izgradnja traje značajno duže od razgradnje. Ukoliko izgradnja i razgradnja kosti nisu u ravnoteži, kao npr. u postmenopauzalnih žena gdje je pregradnja veća 10 puta u odnosu na premenopauzu, zbog velikog broja započetih ciklusa razgradnje dolazi do nepovratnog gubitka kosti. Obzirom na različite stupnjeve poremećaja svaki od tri čimbenika različito pridonosi stupnju osteoporoze u pojedinog bolesnika. Smatra se da ubrzana pregradnja kosti ima najveći utjecaj na povećani rizik za prijelom (49, 50), dok su gubitak koštane mase zbog dobi i duljine menopauze važni patogenetski čimbenici koji variraju i u osoba iste životne dobi (51). Stoga će se u narednim poglavljima opširnije objasniti utjecaj koštane mase i pregradnje kosti na razvoj osteoporoze.

Dva najčešća tipa, postmenopauzalna i senilna osteoporoza, javljaju se u starijoj životnoj dobi. Tip I, postmenopauzalna osteoporoza, nastaje u žena 15 do 20 godina nakon menopauze. Prijelomi se pojavljuju u području spužvastih kostiju, obično na distalnoj podlaktici i kralježcima. Sve bolesnice s tipom I osteoporoze imaju nisku razinu estrogena u krvi (52). Tip II, senilna osteoporoza, pojavljuje se u osoba obaju spolova u dobi iznad 70 godina života. Mehanizam nastanka tog tipa osteoporoze očituje se smanjenom aktivnosti osteoblasta u osoba starije dobi, odnosno smanjenom sposobnosti matične stromalne stanice za diferencijaciju u osteoblaste. Također je smanjeno stvaranje 1,25 dihidroksi vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), što dovodi do smanjene apsorpcije kalcija i sekundarnoga hiperparatireoidizma (53). Praktično je razlikovati još sekundarnu osteoporozu tj. gubitak mineralne gustoće kosti zbog neke druge poznate bolesti (npr. hiperkortizolizam, hiperparatireoidizam, hipertireoza, malnutricija, hipogonadizam, kronična bubrežna insuficijencija i dr.) ili uzimanja lijekova (primjena glukokortikoida, heparin, ciklosporin,

kemoterapeutici i dr.) (54, 55, 56). Idiopatsku osteoporozu nalazimo uglavnom u ranijoj životnoj dobi i nismo u mogućnosti otkriti njen uzrok.

#### **1.4.2. Determinante vršne koštane mase**

Vršna koštana masa (PBM, engl. Peak Bone Mass) se obično definira kao maksimalna koštana gustoća postignuta do 35. godine života i potvrđena DXA mjerenjem. Ona je najznačajniji čimbenik ukupne koštane mase, a nastaje intrauterino, tijekom djetinjstva i adolescencije enhondralnim stvaranjem kosti na hrskavičnim pločama i promjenama oblika kosti (modeliranje). U zdravih djevojaka najbrži rast kosti je između 11 i 14 godine (57), 95-100% PBM-a se postiže u kasnom pubertetu (58), a trajni mali porast nalazimo još od 20 do 29 godine (59). Žene postižu PBM u vratu bedrene kosti oko 20. godine, a u podlaktici i kralježnici oko 30. godine životna (60, 61). Postizanje PBM ovisi o spolu, etničkoj pripadnosti, tjelesnoj konstituciji i dijelu skeleta. Istraživanje u kojem je korištena CT metoda pokazala je značajno veću gustoću kosti u aksijalnom skeletu u adolescenata crne rase (62). Ove razlike nastaju u kasnom stadiju puberteta i ostaju tijekom cijelog života. S druge strane, u apendikularnom skeletu nije bilo razlike u gustoći kortikalne kosti, no veće kosti u pripadnika crne rase imaju mehaničku prednost jer su čvršće i stoga manje lomljive (62). Istraživanja u adolescenata žute rase pokazala su da oni imaju sličnu koštanu masu kao i pripadnici bijele rase, a značajno nižu od crnaca (58). Najvažnija uloga se pripisuje gonadotropnim hormonima, a nedostatak estrogena u adolescenciji onemogućava postizanje vršne koštane mase za 20-30% prema očekivanoj (3). Nagli rast koštane mase u pubertetu udružen je s porastom spolnih hormona i blizinom ploča rasta, a slijedećih 5-15 godina dominantnija je periostalna apozicija (modeliranje) (63). PBM se postiže između 20. i 30. godine života i određena je ponajviše genetskim čimbenicima, koji određuju 50-85% varijacije u koštanoj masi (64). Točna dob u kojoj se postiže PBM ovisi o području skeleta i spolu. PBM u aksijalnom skeletu vjerojatno se postiže pri kraju drugog desetljeća života (65) dok podaci za apendikularni skelet nisu jednoznačni. Longitudinalne studije u kojima je korištena DXA pokazuju da se PBM u kralježnici i vratu bedrene kosti postiže pri kraju puberteta, znatno ranije u žena nego u muškaraca (66). Porast koštane mase osobito je velik u vrijeme adolescencije tako da se oko 25% PBM stekne tijekom dvogodišnjeg perioda ubranog rasta (67). Struktura skeleta i pregradnja kosti vjerojatno su također genetski određeni, a okolinski čimbenici utječu na rast skeleta tijekom djetinjstva i adolescencije. Primjer, razlike u koštanoj masi zbog različitih alela za receptor vitamina D ovise o različitom



unosu kalcija. Od niza gena koji utječu na vršnu koštanu masu čini se da najviše dokaza ima za gen tipa 1 kolagena (Sp-1 mjesto vezanja u prvom intronu gena za kolagen i COLIA1 tj. gen za kolagen tip1- $\alpha$ 1) čiji su polimorfizmi povezani sa smanjenom gustoćom kosti i povišenim rizikom za osteoporotični prijelom (64, 68, 69). Teoretski polimorfizam receptora za vitamin D mogao bi utjecati na mogućnost vezanja vitamina D i mineralnu gustoću kosti, no razlika u alelima za receptor pokazuje malu razliku u koštanoj gustoći (70). Meta analiza 16 različitih studija pokazala je slabu povezanost različitih alela receptora za vitamin D i gustoće kosti na različitim anatomskim mjestima, a mogući su bili utjecaji dobi, etničkih karakteristika i ponašanja ispitanika (68, 71). Česte varijante estrogenskih receptora alfa i beta (ESR1 i ESR2) na stanicama kosti povezane su s mineralnom gustoćom kosti u žena i muškaraca, ESR1 je povezan s učestalijim prijelomima čak neovisno o gustoći kosti (72, 73). Drugi geni, kao oni za transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ) i apolipoprotein E također se povezuju s osteoporozom. Polimorfizam koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP-2) je udružen s niskim BMD-om i povećanim rizikom prijeloma u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (74). Aktiviranje mutacije na genu za receptor lipoproteina niske gustoće (LDL) odgovarajućem proteinu 5 (LRP-5; low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5) povećava koštanu masu i u nekoliko obitelji se javlja autosomno dominantno (75, 76). Izbacivanje gena za LRP-5 izaziva autosomno recesivno sindrom osteoporoza-pseudoglioma s vrlo niskom koštanom masom (77). Spoznaje o genetici u osteoporozi još uvijek nemaju praktičnu terapijsku primjenu.

Manje značajnim, negenetskim čimbenicima, koji su uzrok niske PBM može se pripisati ¼ varijacije, a uključuju nedovoljan unos kalcija u djetinjstvu, nisku tjelesnu težinu u prvoj godini života, nedovoljnu tjelesnu aktivnost i kasni pubertet (78). Hrana obogaćena kalcijem ili njegovim suplementima (oko 1.600 mg dnevno) povećava rast kosti u djece (79, 80). Učinak se očituje još 3-5 godina nakon prestanka nadoknade u jednoj, ali ne i u drugoj studiji (81, 82). Povoljan učinak tjelesne aktivnosti na PBM dokazan je u brojnim opservacijskim i retrospektivnim istraživanjima. Razina tjelesne aktivnosti u predškolske djece u korelaciji je sa sadržajem minerala u kosti i s BMD-om (83), a perimenopauzalne i postmenopauzalne žene koje su tijekom adolescentne dobi aktivno vježbale imale su značajno veći BMD lumbalne kralježnice i bedrene kosti nego one koje tijekom mladosti nisu sudjelovale u redovitoj tjelesnoj aktivnosti (84). Učinak genetskih čimbenika ovisi o dobi i dijelu skeleta, izraženije je u mlađoj populaciji te u kralježnici (85). Spoznaje o djelovanju gena na PBM temelje se na istraživanjima u blizanaca, djevojaka čije majke boluju od osteoporoze, kao i muškaraca i žena čiji prvi rođaci imaju osteoporozu (86, 87). Usprkos

činjenici da geni imaju značajniju ulogu u stvaranju PBM nego na gubitak koštane mase u kasnijoj dobi, broj genetskih istraživanja u odraslih još uvijek premašuje broj istraživanja u djece i adolescenata. Otkrivanje svih, genetskih i okolinskih, čimbenika PBM omogućuje primjenu preventivnih mjera s ciljem povećanja vrijednosti PBM do genetski zadanog maksimuma.

### **1.4.3. Mehanizmi gubitka koštane mase**

Postupni gubitak koštane mase počinje u dobi oko 30. godine života, a može nastati povećanom razgradnjom i/ili usporenom izgradnjom kosti s posljedičnim gubitkom trabekularne kosti i poroznosti kortikalne kosti. Proces koštane pregradnje uvijek započinje razgradnjom kosti koju potom slijedi koštana izgradnja („coupling“). Sekvenca pregradnje jednaka je u spužvastoj i kortikalnoj kosti, trajanje ciklusa iznosi do 8 mjeseci, a ciklus razgradnje je značajno brži od ciklusa izgradnje (88). U zdravih osoba povećanje aktivacijskih mjesta razgradnje dovodi do prolaznog gubitka koštane mase, što izaziva kompenzatorno povećanje stvaranja kosti i dovodi do povratka u ranije stanje koštane mase. Ukoliko razgradnja kosti uzrokuje puknuće trabekularnih ploča ili prekid koštanih gredica gubi se „šablon“ (model) stvaranja nove kosti, značajno se usporava stvaranje nove kosti s posljedično ireverzibilnim manjkom koštane mase i značajno većim gubitkom čvrstoće kosti. Ukoliko procesi izgradnje i razgradnje kosti nisu u ravnoteži, kao što je to slučaj u postmenopauzalnih žena s ubrzanom pregradnjom kosti (do 10 puta), dolazi nepovratno do gubitka prvenstveno trabekularne kosti i povećanja poroznosti kortikalnog dijela. Međutim, biopsije kosti u bolesnica s osteoporozom nisu jasno pokazale povećani broj aktivnih mjesta resorpcije, ali su potvrdile relativno smanjenje stvaranja kosti (89, 90). Što je u diskrepanciji s ranijim pretpostavkama da u stvari veći broj aktivacija mjesta koštane razgradnje dovodi do osteoporoze. Osteoporozu s ubrzanom pregradnjom obilježava predominacija ubrzane koštane razgradnje, a s usporenom pregradnjom prvenstveno defekt u stvaranju kosti.

Osnovni mehanizmi gubitka koštane mase u čestim oblicima osteoporoze (postmenopauzalna, senilna ili sekundarna) uglavnom su poznati, iako mogu biti vrlo složeni i često ne sasvim jasni. Koštana masa u premenopauzalnom periodu uglavnom je stabilna, a od kliničkog značaja su žene s neredovitim ciklusima i ovulacijskim poremećajima s perimenopauzalnim simptomima u kojih se može naći slabiji BMD, osobito u području vrata bedrene kosti i podlaktice (91, 92, 93). Niska koštana gustoća u premenopauzalnih žena

uglavnom je posljedica slabe vršne koštane mase zbog genetskih predispozicija, bolesti ili lijekova koji negativno utječu na rast kosti.

**Idiopatska osteoporoza** često se nalazi u mladih osoba s poremećajem u funkciji osteoblasta ili smanjenog lučenja lokalnih čimbenika rasta (npr. IGF-1) (94, 95). U nekim slučajevima je opisan subklinički nedostatak estrogena i pojačana pregradnja kosti (96), a rezultati biopsija kosti idiopatskih osteoporoza pokazuju pojačanu razgradnju i smanjenu izgradnju skeleta, što nije potvrđeno u zdravih osoba (97). Za ovaj tip osteoporoze dominantne kliničke karakteristike su pojava oko 35. godine života s podjednakom zastupljenosti u muškaraca i žena, češće je kod bjelkinja i ima obiteljsku predispoziciju, a prijelomi zahvaćaju spužvastu kost (kralježnicu) u 90% slučajeva i često su multipli (94, 98).

**Trudnoća i dojenje** mogu uzrokovati prolazni gubitak koštane mase (99, 100), osobito u žena koje su prisiljene ležati zbog održavanja trudnoće (101). Tijekom dojenja žena izgubi 1,5-4,0% koštane mase kralježnice i vrata bedrene kosti (102). Nisu poznati anabolički mehanizmi, no potrebno je 18 mjeseci do nekoliko godina da se koštana masa spontano popravi nakon prestanka dojenja (103, 104). Gubitak koštane mase povezan je s pojačanim potrebama za kalcijem i amenorejom (prolaktin) zbog dojenja. Vjeruje se da PTH sličan protein (PTHrP), koji se luči iz dojke u trudnoći i tijekom dojenja, ima važnu ulogu u brzom gubitku koštane mase, bez obzira na unos kalcija, a u pretkliničkim studijama na miševima potvrđeno je da uklanjanjem PTHrP tijekom kasne trudnoće i dojenja smanjuje pregradnju kosti i gubitak koštane mase (105). Izgleda da prolazni gubitak koštane mase tijekom trudnoće i dojenja, bar u ranijoj životnoj dobi, ne uzrokuje povećani rizik od prijeloma u postmenopauzi (106, 107).

**Transplantacija organa** ima povećani rizik za osteoporozu zbog glukokortikoidne i imunosupresivne terapije (108). Dodatni čimbenik u transplantaciji bubrega je sekundarni hiperparatireoidizam.

**Liječenje zloćudnih bolesti** kemoterapijom i iradijacijom često dovodi do hipogonadizma, a dodatna primjena glukokortikoida i nekih citostatika izravno smanjuje koštanu masu (109). Neke od zloćudnih bolesti, same po sebi, povezane su sa smanjenom koštanom masom (110).

**Vitamin B12** manjak s posljedičnom pernicioznom anemijom ima povećani rizik od osteoporoze i rizika prijeloma kralježnice i vrata bedrene kosti (111, 112), a vjerojatni patofiziološki mehanizam je smanjenje osteoblastične aktivnosti opisano u pretkliničkim istraživanjima (113). Jedna prospektivna klinička studija potvrdila je gubitak koštane mase u

žena s nižim koncentracijama vitamina B12 (114). Neki za osteoporozu optužuju niske folate (115) ili visoki homocistein (116).

**Rana postmenopauza** je obilježena vrlo brzim gubitkom koštane mase zbog ubrzane pregradnje, osobito spužvaste kosti (117, 118). Zbog iscrpljenja jajnika dolazi do naglog gubitka estrogena koji se sada malim dijelom mogu stvarati perifernom konverzijom iz androgena. Niske doze estrogena koreliraju s niskom koštanom masom, ali korelacija s većom učestalosti prijeloma nije tako jasna (119). Kliničke smetnje i gubitak koštane mase u mnogih žena počinju čak u perimenopauzi i bolje koreliraju s vrijednosti FSH (120). Blokiranje konverzije androgena u estradiol (inhibitorima aromataze) povećava razgradnju kosti (121), a terapija estrogenima sprječava gubitak koštane mase i dugo je godina bila prva linija prevencije i liječenja osteoporoze, do spoznaja o kardiovaskularnim i rizicima za karcinom dojke (122, 123). Postmenopauzalna ubrzana razgradnja kosti traje 10-tak godina, potom se uspori i prilagodi očekivanoj za dob (117).

**Starenje** uzrokuje gubitak koštane mase počevši u 4. i 5. dekadi sporim gubitkom kortikalne i trabukularne kosti u muškaraca i žena, a u ženskoj populaciji se nastavlja i do 10. dekade života (117, 124). Razlozi sporog gubitka koštane mase objašnjavaju se porastom razine parathormona (PTH) i slabosti osteoblasta (125). Serumska vrijednost PTH je u korelaciji s biljezima koštane pregradnje, a infuzijom kalcija postižu se vrijednosti kao u mladoj odrasloj populaciji (126). U starijoj dobi je smanjenja reapsorpcija kalcija u bubrezima i smanjena apsorpcija kalcija u crijevima zbog deficita vitamina D<sub>3</sub> (smanjenje aktivnosti 1- $\alpha$  hidroksilaze u bubrezima) što sve doprinosi porastu koncentracije PTH (sekundarni hiperparatireoidizam). Također se vrlo često nalazi rezistencija na vitamin D, kao i deficit vitamina D uslijed smanjenog izlaganja sunčevim zrakama. Porast koncentracije PTH koji nastaje s dobi, u žena može biti i indirektna posljedica manjka estrogena, jer nadomjesnim hormonskim liječenjem estrogenima smanjuju se biljezi pregradnje i serumska vrijednost PTH, pojačava apsorpcija kalcija (moguće zbog porasta 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>) i pojačava PTH neovisna reapsorpcija u bubrezima te smanjuje sekretornu rezervu PTH (125, 126). Tako se nadomjeskom kalcija u prehrani i vitaminom D može ublažiti gubitak kosti uzrokovan starenjem, osobito u starijoj populaciji, kod slabije pokretnih i hospitalnih osoba (127).

**Osteoporoza muškaraca** postaje sve intrigantnija, a gonadalna slabost i neosjetljivost androgena glavni su rizični čimbenici za mušku osteoporozu stoga je terapija testosteronom opravdana u hipogonadalnoj osteoporozi (128, 129). Klinički je važno kod muškaraca mjeriti testosteron i obratiti pozornost na gubitak libida, impotenciju i atrofiju testisa (130). Gubitak androgena u žena, slično kao i estrogena imati će za posljedicu gubitak koštane mase! S druge

strane muškarci imaju značajno manji gubitak koštane mase tijekom života. Starenjem, u muškaraca i žena, dolazi do smanjenja gustoće kosti, no zbog veće periostalne apozicije i manje endokortikalne apsorpcije kosti, gubitak kortikalne kosti u muškaraca je manji nego u žena. Osim toga, gubitak spužvaste kosti u muškaraca je karakteriziran stanjenjem koštanih trabekula, nasuprot prekidu njihova kontinuiteta kod žena, što kostima u muškaraca daje još jednu mehaničku prednost (131).

Niz drugih čimbenika može utjecati na mogućnost i brzinu gubitka koštane mase u premenopauzi što uključuje dob, promjene u tjelesnoj težini i indeksu tjelesne mase (BMI), unosu kalcija i vitamina D, tjelesnoj aktivnosti i načinu života, prehrani, uzimanju alkohola, pušenju i broju trudnoća (132, 133, 134, 135). Osim navedenih čimbenika, ubrzanom gubitku koštane mase mogu doprinijeti još brojne bolesti i mnogi lijekovi, a najčešće su navedene u tablici 1.2. (136).

**Tablica 1.2.** Najčešće bolesti i lijekovi koji su uzrok gubitka koštane mase, prema važnosti.

<b>Bolesti</b>	<b>Lijekovi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• primarni hiperparatireoidizam i druge metaboličke bolesti kostiju</li> <li>• hipogonadizam, amenoreja, kronične anovulacije</li> <li>• Cushingov sindrom</li> <li>• tireotoksikoza</li> <li>• insulin ovisna šećerna bolest</li> <li>• reumatoidni artritis</li> <li>• poremećaji gastrointestinalne i hepatobilijarne funkcije</li> <li>• kronična bubrežna insuficijencija</li> <li>• transplantacija organa</li> <li>• perniciozna anemija</li> <li>• kronična opstruktivna bolest pluća</li> <li>• osteogenesis imperfecta</li> <li>• dugotrajno mirovanje</li> <li>• trudnoća i laktacija</li> <li>• transplantacija organa</li> <li>• mastocitoza</li> <li>• endometrioza, hipofosfatazija, idiopatska skolioza, limfomi i leukemije, mastocitoza, multipli mijelom, hemofilija, multipla skleroza, sarkoidoza, talasemija, akromegalija, Addisonova bolest, hiperprolaktinemija, amiloidoza, ankilozantni spondilitis, kongenitalna porfirija, tumori koji secerniraju rPTH peptid, ...</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dugotrajno liječenje kortikosteroidima (ekvivalent pronizona &gt; 5 mg dnevno, &gt; 3 mj.)</li> <li>• citotoksični lijekovi (kemoterapija), imunosupresivi</li> <li>• antikonvulzivi</li> <li>• prekomjerna doza hormona štitnjače</li> <li>• vitamin A, retinoidi</li> <li>• dugotrajna primjena antikoagulansa, heparin</li> <li>• tamoksifen, Arimidex (premenopauzalno)</li> <li>• lijekovi koji dugotrajnije koče funkciju gonada</li> <li>• aluminij, litij</li> </ul>

#### 1.4.4. Uloga sistemskih hormona

Za normalan razvoj kosti neophodni su pojedini hormona kao i njihova odgovarajuća interakcija, prvenstveno spolnih, te hormona rasta (GH) i čimbenika rasta sličnih inzulinu (IGFs). Bolesnici s idiopatskim hipogonadotropnim hipogonadizmom imaju manji BMD uslijed smanjenog rasta koštane mase tijekom puberteta (137). Također, amenoroične djevojke imaju manji BMD lumbalne kralježnice u usporedbi s djevojkama koje imaju normalne menstruacijske cikluse (138). Manja PBM je nađena i u osoba s idiopatskim zakašnjelim pubertetom (139). Tijekom starenja i u menopauzi dolazi do promjena u lučenju niza hormona koji utječu na mineralnu gustoću kosti, međutim njihova serumska koncentracija je slična u kontrolnih ispitanika prilagođenih dobi i menopauzi. Usprkos tome, promjene hormona koji reguliraju kalcij, spolnih hormona i onih koji reguliraju rast tijekom života značajno utječu, izravno ili posredno na osteoporozi i rizik od prijeloma.

**PTH** - poremećaji regulacije kalcija koji uzrokuju osteoporozi su hiperparatireoidizam, te rahitis ili osteomalacija zbog nedostatka vitamina D. Nalazimo karakteristične biokemijske poremećaje serumskog kalcija i fosfata, a u kasnijoj fazi bolesti tipična je histološka slika kosti koja se ne nalazi u osteoporozi. Blagi porast PTH i nedostatak vitamina D karakteristični su za stariju životnu dob, uz degenerativne promjene gastrointestinalnog sustava i bubrega, uzroci su smanjeni unos kalcija (nepodnošenje mliječnoga) i smanjeni unos odnosno stvaranje vitamina D zbog manje izloženosti suncu, što je značajan čimbenik u nastanku senilne osteoporoze (127). Nekoliko studija pokazuje značajno manju razinu vitamina D u osoba koje su imale osteoporotični prijelom, u odnosu na one koji imaju samo osteoporozi (140, 141, 142). Čak 97% bolesnika starijih od 50 godina hospitaliziranih zbog netraumatskog prijeloma imalo je jaki deficit vitamina D (< 30 ng/ml), a koncentracija je bila značajno veća u onih koji su dobivali 400 IU vitamina D dnevno (143). Hiperparatireoidizam uzrokuje veći gubitak kortikalnog dijela kosti, nego spužvastog (trabekularnog), što ima za posljedicu manji broj prekinutih trabekula (gredica) u odnosu na osteoporozi.

**Kalcitonin** - je inhibitor koštane razgradnje i koristi se u liječenju osteoporoze, stoga je bilo za očekivati da će nedostatak kalcitonina imati važnu ulogu u nastanku osteoporoze (144). Međutim endogeni kalcitonin nije značajan čimbenik u nastanku osteoporoze, a čak postoje pretklinički radovi koji pokazuju porast koštane mase nakon uklanjanja gena za kalcitonin (145).

**Estrogeni** - inhibiraju koštanu razgradnju i njihov manjak ima centralnu ulogu u nastanku postmenopauzalne osteoporoze (146). Za više od 75% gubitka koštane mase u doba postmenopauze odgovoran je nedostatak estrogena, a značajno manje dob (147). Gubitak estrogena u kasnijoj generativnoj dobi, kao i u menopauzi, dovodi do povećanja koštane resorpcije uzrokovane povećanim lučenjem osteoklastogenih citokina i posljedično brzog gubitka koštane mase. Navedenim mehanizmom se objašnjava gubitak koštane mase u panhipopituitarizmu, preranoj menopauzi i hiperprolaktinemiji, a u izravnoj su korelaciji s trajanjem navedenih stanja. Nadoknadom estrogenih hormona najčešće smo u mogućnosti značajno popraviti koštanu masu što potvrđuje njihovu etiopatogenetsku ulogu. Žene starije dobi (> 70 godina) koje stvaraju manje količine estrogena imaju značajno manji rizik za prijelom kralježaka ili vrata bedrene kosti, u odnosu na one koje imaju potpuni manjak estrogena (148). Čak i nakon 25-30 godina menopauze primjena estrogena smanjuje broj aktivnih mjesta pregradnje i povećava koštanu masu, a smanjenje izgradnje samo je „coupling“ fenomen (149). Međutim, i studije na muškarcima su pokazale da i u njih koncentracija estrogena bolje korelira s BMD-om nego koncentracija testosterona (126). Čini se da je estrogen u oba spola glavni spolni steroid koji regulira rast i sazrijevanje kosti (150). Naime, u muškaraca je glavni spolni hormon testosteron, a djelovanje na kost posredovano je vezanjem na androgeni receptor, no najveći se dio učinka ostvaruje nakon konverzije u estrogen putem specifične aromataze prisutne u osteoblastima (151). To potvrđuju i opisi muškaraca s manjkom aktivnosti aromataze ili s oštećenom funkcijom receptora za estrogen u kojih je, usprkos normalnoj koncentraciji testosterona, bila prisutna osteoporoza i zakašnjelo zatvaranje epifiznih pukotina, a liječenje estrogenima je zatvorilo epifizne pukotine i popravilo koštanu masu (152, 153). U liječenju osteoporoze testosteronom na porast koštane mase bolje korelira porast koncentracija estrogena nego testosterona (154). Točan mehanizam djelovanja estrogena na kost još nije u potpunosti razjašnjen, izgleda da estrogen bolje djeluje na regulaciju koštane razgradnje, dok su oba spolna hormona, estrogen i testosteron, važni za koštanu izgradnju (155, 156). Estrogeni ne inhibiraju osteoklaste izravno „in vitro“, izgleda da se glavni učinak na funkciju osteoblasta i osteoklasta odvija putem modulacije faktora rasta i citokina na lokalnoj razini: estrogen povećava sekreciju čimbenika rasta sličnog inzulinu (IGF-1), osteoprotegerina, transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ ), a smanjuje sintezu interleukina 1 (IL-1) i čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). Osim smanjenja koštane pregradnje i nakon dugotrajne menopauze, smanjenjem broja aktivnih mjesta pregradnje, estrogeni smanjuju osteoklastima induciranu dubinu erozijske šupljine (157). U „in vitro“ studijama estrogeni ubrzavaju apoptozu osteoklasta i smanjuju njihov životni vijek,

a primjena anti-TGF- $\beta$  inhibira taj učinak (158). Protektivni učinak estrogena na kost može biti posredovan povećanim lučenjem TGF- $\beta$  iz osteoblasta. Nakon ovarijskektomije u krvi raste TNF- $\alpha$  stvoren u monocitima periferne krvi i stanicama koštane srži, a koji stimulira stvaranje osteoklasta (osteoklastogenezu) (159). Također, u pretkliničkim studijama s blokiranjem TNF- $\alpha$  ili kod T-stanično defektnih miševa, usprkos ovariektomiji, nema osteoklastima posredovane razgradnje kosti niti gubitka koštane mase, a ti rezultati upućuju da estrogeni preveniraju koštanu razgradnju inhibicijom lučenja TNF- $\alpha$  (160, 161). Osteociti i hrskavične ploče rasta sadrže  $\alpha$  i  $\beta$  izoforme estrogenih receptora koji mogu djelovati različitim mehanizmima u različitim tkivima (kost, dojka, uterus, ..), npr. kao modulatori estrogenih receptora (162, 163). Estrogeni kontroliraju aktivnost osteoklasta posredno, putem djelovanja na kontrolu lučenja proresorptivnih citokina iz osteoblasta: osim TNF- $\alpha$ , na IL-1 i IL-6. Uz to estrogeni imaju bitnu ulogu u novootkrivenu sustavu RANKL-OPG-RANK (engl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) koji ima važnu ulogu za sazrijevanje i funkciju osteoklasta. OPG spada u superfamiliju TNF-receptora, veže se za RANKL i na taj način sprečava vezanje RANKL-a za RANK na nezrelom osteoklastu. Posljedica je otežana diferencijacija nezrelih osteoklasta i neaktivnosti zrelih osteoklasta. U nedostatku estrogena povišena je razina IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i RANKL-a, a snižena razina OPG, što uzrokuje resorpciju kosti. Estrogeni utječu i na duljinu života osteoblasta i osteoklasta kontrolom apoptoze. U nedostatku estrogena, produžen je životni vijek osteoklasta, a skraćen osteoblasta.

**Androgeni** - manjak, slično kao i estrogeni, uzrokuje gubitak koštane mase pojačanom pregradnjom kosti. Važnost androgena (uglavnom testosteron) i estrogena (uglavnom estradiol) koji se metaboliziraju u žena iz androgena nije sasvim jasna (164). Androgeni imaju izravno stimulirajuće djelovanje na stvaranje kosti i često su sniženi u bolesnica s prijelomima kralježaka, u odnosu na one koje nemaju prijelome (165).

**Progesteron** - receptori se nalaze na osteocitima, no njihova uloga „in vivo“ malo je poznata (166). Vjerojatno djeluju slično kao androgeni ili estrogeni, a progesteron može djelovati i na glukokortikodne receptore kao antagonist ili blagi agonist (167).

**Folikul stimulirajući hormon (FSH) i inhibin** - moguće izravno djelovanje FSH na kost objašnjava se ubrzanom pregradnjom kosti u perimenopauzi, u slučajevima normalnog ili graničnog estrogena, ali visokog FSH i niskog inhibina (168, 169).

**Hormoni štitnjače** - povećavaju koštanu razgradnju i izgradnju u slučajevima hipertireoze ili tireosupresivne terapije koja može uzrokovati osteoporozu. Obzirom na temu



disertacije utjecaj hormona štitnjače i TSH na osteoporozi će biti opisani u posebnom poglavlju.

**Glukokortikoidi** - imaju vrlo važnu ulogu u nastanku sekundarne osteoporoze, a prekomjerno lučenje prvenstveno djeluje inhibirajuće na stvaranje kosti, smanjenjem replikacije, migracije, diferencijacije i životnog ciklusa osteoblasta, a također mogu stimulirati osteoklastogenezu (170). Dolazi do poremećaja u stvaranju lokalnih čimbenika rasta, osobito IGF-1, i njihovih proteina, kao i prostaglandina. Osim što inhibiraju funkciju osteoblasta i stimuliraju osteoklastogenezu, glukokortikoidi smanjuju reapsorpciju kalcija u tubulima bubrega i apsorpciju u tankom crijevu što uzrokuje sekundarni hiperparatireoidizam, a također uzrokuju sekundarni hipogonadizam. Višak glukokortikoida, bilo da se radi o endogenom višku, ili još češće, o egzogenom višku uslijed kronične primjene ovih lijekova, najčešći je uzrok sekundarne osteoporoze (tablica 1.2.). Bolesnici s visokim dozama glukokortikoida (prosječno prednisona 21 mg dnevno) izgube prosječno 27% mineralne gustoće kosti u kralježnici tijekom prve godine liječenja (171). Također mogu imati veliki značaj u gubitku koštane mase pacijenata s teškom depresijom, alkoholizmom ili anoreksijom nervozom.

**Hormon rasta (GH)/IGF** - najvažniji je čimbenik skeletnog rasta, a manjak ili poremećaj receptora uzrokuje patuljasti rast i nisku koštanu masu. Uloga u nastanku osteoporoze je relativno mala, a tijekom dobi dolazi do smanjenog lučenja GH i IGF-1, kao i IGF-proteinskog nosača 3 (IGF-BP3) u muškaraca i žena (172, 173). IGF-1 je i lokalni čimbenik rasta tako da je opisana niska koncentracija u kosti nekih pacijenata s prijelomom vrata bedrene kosti (174).

#### **1.4.5. Uloga lokalnih citokina i prostaglandina**

Činjenica da postoje male razlike u serumskim koncentracijama hormona i različiti stupanj osteoporoze u relativno homogenim skupinama (prema dobi, spolu, menopauzi i sl.) navela je na zaključak da postoje lokalni regulatori. Pregradnja i struktura kosti određene su lokalnim utjecajem na koštane stanice, a mnogi lokalni regulatori (citokini, prostanoidi, faktori rasta) stvaraju se u koštanoj srži ili stanicama kosti i poznati su zahvaljujući pretkliničkim istraživanjima na životinjama. Mnogi citokini imaju utjecaja na funkciju koštanih stanica (Tablica 1.3.). Kratkotrajne kulture koštane srži postmenopauzalnih žena stvaraju više IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i prostaglandina E2, u odnosu na premenopauzalne žene (159).

**Tablica 1.3.** Citokini s mehanizmom utjecaja na kost (razgradnja i izgradnja kosti).

Citokini	Razgradnja	Izgradnja	Stvaranje prostaglandina
Interleukin-1	+	-	+
TNF-alfa	+	-	+
Interleukin-4	-	-	-
Interleukin-6	+	+	+
Interleukin-7	+	?	?
Intereukin-11	+	+	?
Interleukin-13	-	?	-
Interleukin-18	-	?	?
Čimbenik inhibicije leukemije	-	+	+
Interferon-gama	-	-	-

**Interleukin-1 i čimbenik nekroze tumora alfa (IL-1 i TNF- $\alpha$ )** jaki su stimulatori razgradnje, a mogu blokirati izgradnju kosti. Stvaraju se u stanicama koštane srži, osobito u makrofagima, dok IL-1 mogu stvarati i stanice kosti (175). Blokiranjem IL-1 i TNF- $\alpha$  u ovarijektomiranih (OVX) životinja smanjuje se razgradnja kosti (176, 177), a supernatant kulture koštane srži stimulira razgradnju kosti ovisnu o prostaglandinu koja se može inhibirati antagonistima IL-1 receptora (178). U kulturama humanih mononuklearnih stanica postmenopausalnih žena pojačana je aktivnost IL-1 (179). Našlo se da žene s deficitom estrogena imaju veću ekspresiju aktivirajućeg IL-1 receptora (IL-1R1), a žene s dosta estrogena imaju veću ekspresiju inhibirajućeg IL-1 receptora (IL-1R2) (180).

**Interleukin-6 (IL-6) i odgovarajući citokini** - IL-6 je glavni citokin koji se stvara u osteoblastima i drugim stanicama koštane srži. Stimulatori razgradnje kosti (PTH, prostaglandin E2 i IL-1) stimuliraju stvaranje IL-6 u osteoblastima (181). IL-6 stimulira osteoklastogenezu i razgradnju kosti, najvećim dijelom preko prostglandinskog mehanizma

(182), a stvaranje IL-6 i njegovih receptora regulirano je lučenjem spolnih hormona (183). IL-7 stimulira proliferaciju beta stanica i uzrokuje gubitak kosti kao u OVX životinja, a IL-4 i IL-13 inhibiraju razgradnju kosti, bar dijelom putem prostaglandinskog mehanizma (184, 185, 186).

**Prostaglandini** su snažni regulatori funkcije koštanih stanica, osobito prostaglandin E2, pojačavaju razgradnju i izgradnju kosti u životinja i ljudi (187). Izgleda da mnogi lokalni i sistemski čimbenici koji reguliraju koštani metabolizam djeluju na stvaranje prostaglandina u kosti (Tablica 1.3.), osobito je potvrđeno kod skeletnog odgovora na mehaničku silu (188). Prekomjerno stvaranje prostaglandina pojačava razgradnju kosti, a smanjeno oštećuje odgovor za izgradnju kosti. Prostaglandini su povišeni u OVX štakora, a smanjeni nakon terapije estrogenima (189). Prostaglandini uzrokuju pojačanu razgradnju, a ne smanjuju izgradnju kosti, u imobilizaciji (190). Nesteroidni antireumatski lijekovi (NSAR), koji inhibiraju stvaranje prostaglandina u ljudi, pokazuju nešto slabiji gubitak koštane mase u ljudi i životinja, no rezultati nisu jednoznačni vjerojatno zbog doze i selektivnosti lijekova.

#### **1.4.6. Uloga lokalnih čimbenika rasta**

Dvije glavne skupine čimbenika rasta koje se stvaraju u koštanim stanicama mogu biti važni u patogenezi osteoporoze. Najvažniji za diferencijaciju i funkciju osteoblasta su IGF i njihovi vežujući proteini (191). TGF- $\beta$  i skupina koštanih morfogenetskih proteina (osobito neki članovi skupine BMP) važni su u embrionskoj diferencijaciji (192), a polimorfizam gena za BMP-2 povezan je s osteoporozom (74).

**Inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-1)** tijekom starenja se smanjuje što je u korelaciji s gubitkom koštane mase i sadržaju IGF-1 i IGF-2 (174). Nije baš jasan učinak estrogena na IGF-1, no smatra se da IGFs imaju važnu ulogu u nastanku idiopatske osteoporoze usporene pregradnje u muškaraca i premenopauzalnih žena (95).

**Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ )** u kosti se nalazi u velikim koncentracijama. Snažno inhibira razgradnju kosti, a stimulira izgradnju i može imati važnu ulogu kao čimbenik usklađivanja koštane pregradnje (coupling factor). Npr. TGF- $\beta$  se luči iz koštanih stanica tijekom razgradnje kosti, usporavajući razgradnju induciranjem apoptoze osteoklasta, a potom ubrzava koštanu izgradnju stimuliranjem replikacije i diferencijacije prekursora osteoblasta (158). Prema navedenom mehanizmu manjak TGF- $\beta$  može uzrokovati osteoporozu što je i opisano (193), no također i suvišak, paradoksalno, uzrokuje jaku

osteoporozu (194). Polimorfizam TGF- $\beta$ -1 je znatno češći u žena s osteoporozom, udružen s niskom koštanom masom i pojačanom pregradnjom kosti (195).

**Koštani morfogenetски proteini (BMPs)** su molekule odgovorne za osteoinduktivno djelovanje u kosti i drugim tkivima (196). Jedinstvena sposobnost stvaranja kosti, te njihova prisutnost u koštanom tkivu upućuju na njihovu nezaobilaznu regulacijsku ulogu u procesima morfogeneze i popravka kosti, kao i u neprestanom održavanju koštanog tkiva. BMP-i djeluju i kao diferencijacijski čimbenici različitih fenotipova mezenhimskih stanica (197).

**PTH sličan protein (PTHrP)** se stvara u koštanim i hrskavičnim stanicama, ima važnu ulogu u razvoju kosti i hrskavice, a u odrasloj dobi djeluje kao lokalni čimbenik rasta (198). PTHrP se luči iz mliječne žlijezde i ima važnu ulogu u nastanku osteoporoze tijekom dojenja (105).

**Čimbenik rasta fibroblasta** se stvara u koštanim i stanicama vezivnog tkiva, a reguliraju ga PTH, prostaglandin, E2 i TGF- $\beta$ . On smanjuje sintezu kolagena „in vitro“, a može stimulirati izgradnju kosti „in vivo“ (199, 200).

## 1.5. Dijagnostika osteoporoze

Rana dijagnostika bolesti u osobe s visokim rizikom za prijelom predstavlja najveći izazov kliničaru, a određivanje BMD-a u navedenim područjima visokog rizika za prijelom najbolja je dijagnostička metoda (201). Klasične radiološke pretrage nisu dovoljno pouzdane za procjenu koštane mase jer se ne može prepoznati gubitak kosti manji od 30%. Novije metode kao što su jednofotonska i dvofotonska apsorpciometrija, dvoenergetska apsorpciometrija X-zraka (DXA), kvantitativna kompjutorizirana tomografija te neutronska aktivacija tjelesnoga kalcija omogućuju veću preciznost i rano otkrivanje gubitka koštane mase (53). DXA mjerenje je opće prihvaćeno zbog jednostavnosti i pouzdanosti mjerenja, male doze zračenja, praktičnosti određivanja dijagnostičke T vrijednosti tj. odstupanja od vršne vrijednosti gustoće kosti za mladu odraslu populaciju. Iako BMD ima svojih ograničenja, npr. rendgensko zračenje, lažno negativni nalazi, ne očitava promjene u arhitekturi kosti, ne uzima u obzir „kvalitetu“ kosti i neke druge čimbenike (rizični čimbenici) koji pridonose većoj sklonosti prijelomu, ona ipak vrlo dobro korelira s čvrstoćom kosti i vrlo je značajan prediktor rizika prijeloma (202, 203, 204).

SZO je 1994. godine definirala osteoporozu kao smanjenje vrijednosti prosjeka BMD-a slabinske kralježnice (L1-L4) ili vrata bedrene kosti (neck ili total) od 2,5 SD ili veće u odnosu na prosječnu vrijednost za mladu odraslu populaciju zdravih žena bijele rase (T-vrijednost ili T-sc.) za žene u postmenopauzi u svih etničkih grupa i muškarce starije od 50 godina (29). Prema stavu Međunarodne udruge za kliničku denzitometriju (ISCD) u mladih žena s niskim BMD-om tj. T-sc.  $<2,0$  i s povećanim rizikom za prijelom ili sekundarnom osteoporozom (glukokortikodi, hipogonadizam ili hiperparatireoidizam) također se postavlja dijagnoza osteoporoze (205). Klinička dijagnoza osteoporoze postavlja se dokazom osteoporotičnog prijeloma bez obzira na BMD, ukoliko se stvarno radilo o netraumatskom prijelomu (206). Za muškarce mlađe od 50 godina i premenopauzalne žene bez osteoporotičnog prijeloma, osim niske BMD vrijednosti, potrebno je uzeti u obzir rizične čimbenike za prijelom (npr. glukokortikoidna terapija, hiperparatireoidizam, ...) te uspoređivati s vrijednostima referentnim za dob pacijenta (Z-vrijednost ili Z-sc.) (207). T-vrijednost između -1 i -2,5 SD predstavlja osteopeniju tj. predstadij osteoporoze, dok je nalaz T-vrijednosti veći od -1 SD uredan nalaz mineralne gustoće kosti. Ukoliko uz dijagnostički kriterij BMD-a za osteoporozu postoji i osteoporotični prijelom stanje se klasificira kao teška osteoporozna (30). U novije doba se primjenjuje kvantitativni ultrazvuk (QUZV) za posredno mjerenje koštane mase (i strukture) kalkaneusa i patele na osnovu prolaza ultrazvučnih valova. QUZV mjeri brzinu prolaska zvuka kroz kost (SOS- Speed Of Sound), kao i slabljenje ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (BUA-Broadband Ultrasound Attenuation), a iz ova dva mjerenja algoritmom se izračunava indeks kvantitativnog ultrazvuka (QUI-Quantitative Ultrasound Index), parametar koji predstavlja kombinaciju BUA i SOS. QUZV, čini se, za razliku od DXA, pruža određene informacije o strukturi i mikroarhitekturi kosti. Petna kost se doima kao prikladno mjesto mjerenja budući da je lako dostupna, i da sadrži 90% spužvaste kosti. Prednosti ove metode su jednostavnost i praktičnost, mala cijena, brzina, isključenje zračenja, no nedostatak mu je manja preciznost od ranije navedenih metoda. Mjerenja UZV-om dobar su predskazatelj za osteoporotične prijelome vrata bedrene kosti, čak i bolji od kliničkih rizičnih čimbenika za procjenu osteoporoze u žena, stoga je metoda vrlo pogodna u epidemiološkim istraživanjima ili za probir rizične populacije (208, 209).

Biokemijski nalazi u osteoporozu obično su normalni; u ranoj postmenopauzi bolesnice mogu imati povećan omjer kalcija i hidroksiprolina prema kreatininu u uzorku jutarnje mokraće, što je posljedica povećane resorpcije kosti. Vrijednost alkalne fosfataze u krvi je normalna, vjerodostojniji parametar je koštana alkalna fosfataza, a blago povišenu vrijednost nalazimo kod pridruženih prijeloma. Veću specifičnost za procjenu metaboličke aktivnosti

koštanog tkiva (pregradnje) omogućuje mjerenje piridinolinskih i deokspiridinolinskih poprečnih sveza (razgradni produkti kolagena – izraz aktivnosti osteoklasta) te mjerenje osteokalcina i dijela molekule prokolagena (izraz aktivnosti osteoblasta). Koštana biopsija nije metoda izbora u bolesnika s osteoporozom, a koristi se u slučajevima pridruženih metaboličkih bolesti ili nejasne osteoporoze. Dobro je uz koštanu biopsiju učiniti pretragu koštane srži, posebno u mladih osoba kada postoji sumnja na hematološku bolest. Scintigrafija kostiju korisna je metoda za dokazivanje svježih prijeloma, ali i za isključivanje koštanih metastaza tumora.

Kvaliteta kosti teško je mjerljiva komponenta čvrstoće, a određuje je brzina koštane pregradnje, arhitektura kosti (veličina i oblik, ili geometrija), mikroarhitektura (npr. debljina trabekula, trabekularna povezanost, broj perforacija, debljina i gustoća korteksa), akumulacija mikrooštećenja, kvaliteta osnove, stupanj i svojstva mineralizacije (veličina kristala i usmjerenost) (210). Osim mjerenja brzine koštane pregradnje, rutinskim pretragama u kliničkoj praksi nije moguće mjeriti kvalitetu kosti. Napretkom tehnike mikrokomputorizirane tomografije ( $\mu$ CT) i magnetske rezonance (MR) vremenom će nam omogućiti veću dostupnost mjerenja kvalitete kosti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

DXA mjerenje mineralne gustoće kosti vrlo je precizno, jednostavno i brzo uz minimalno zračenje (211, 212), stoga je dijagnostički pouzdano, medicinski prihvatljivo, predskazuje rizik osteoporotičnog prijeloma i kontrolira učinak liječenja te predstavlja zlatni standard u dijagnostici i kontroli osteoporoze (213, 214). DXA mjerenje je kontraindicirano u trudnica, iako je doza zračenja minimalna tj. odgovarajuća dnevnom primljenom iz svemira ( $<7$  mSv). Nekad je nije moguće izvesti zbog deformiteta skeleta (skolioza, osteoartritis, kirurške operacije i sl.), a nije indicirano ukoliko nam ne pomaže u kliničkoj prosudbi ili kontroli bolesti. DXA mjerenje mineralne gustoće kosti se savjetuje provoditi na istom aparatu (čak isti tehničar), a učestalost kontrole ovisi o očekivanim promjenama BMD-a, stoga intervali mogu iznositi od 6 mjeseci (npr. glukokortikoidna osteoporoza, hiperparatireoidizam, osteomalacija i sl.) do 2 ili više godina (npr. preventivna terapija, kontrole) (215, 216). ISCD preporuča kao dijagnostički kriterij mjerenje slabinske kralježnice (L1-L4), kuka (total) i vrata (neck) bedrene kosti, uz korištenje različitih referentnih vrijednosti za mušku i žensku populaciju te korekciju prema dobi, spolu i rasi za Z-vrijednost (207). Ukoliko je nalaz 1/3 podlaktice najslabija gustoća kosti u skeletu tada je racionalno prihvatiti tu vrijednost kao dobar predskazatelj rizika prijeloma što je u skladu s kriterijima SZO-a.

Kako klinički rizični čimbenici za osteoporotični prijelom slabo koreliraju s BMD-om (217), DXA mjerenje mineralne gustoće kosti kliničarima je opće prihvaćena metoda za procjenu rizika prijeloma i odluke o početku farmakološkog liječenja u svrhu smanjenja rizika od prijeloma (218, 219, 220). No postoji velika razlika u kliničkim smjernicama kada je indicirano učiniti DXA mjerenje mineralne gustoće kosti što ima značajne medicinske i ekonomske implikacije (221, 222, 223). Smjernice variraju prema populaciji na koju se primjenjuju, prihvaćenim rizičnim čimbenicima, definiciji osteoporotičnog prijeloma, korištenoj metodologiji i stupnju prihvaćenosti medicine temeljene na dokazima u odnosu na mišljenje eksperata (136). Klinički rizični čimbenici se koriste za probir rizične populacije, no ne mogu zamijeniti mjerenje BMD-a niti se mogu koristiti za predviđanje BMD-a pojedinog pacijenta (224). Cilj mjerenja mineralne gustoće kosti je postavljanje dijagnoze osteoporoze, procjena rizika prijeloma i praćenje učinka liječenja. Najobuhvatnije i klinički najprihvatljivije indikacije za mjerenje BMD-a postavilo je ISCD, a prema njima sve žene u dobi 65 godina i starije, postmenopauzalne žene mlađe od 65 godina s rizičnim čimbenicima za osteoporoze, muškarci u dobi 70 godina i stariji, odrasli s osteoporotičnim prijelomima, bolestima ili stanjima odnosno na lijekovima koji imaju rizik gubitka koštane mase, bilo kome tko treba uzimati lijekove za osteoporoze ili se nalazi gubitak koštane mase, ili se već liječi pa je potrebna kontrola učinkovitosti, odnosno je prekinuto liječenje npr. estrogenima trebaju učiniti DXA mjerenje gustoće kosti (225). Nalaz koštane denzitometrije treba, prema konsenzusu ISCD-a, interpretirati educirani liječnik, s uputama o daljnjem dijagnostičkom i terapijskom postupku (225). Usprkos značajnim razlikama kliničke smjernice za dijagnostiku i liječenje osteoporoze od National Osteoporosis Foundation (NOF), International Osteoporosis Foundation (IOF) i International Society for Clinical Densitometry (ISCD) značajno su unaprijedile medicinske standarde, ranu dijagnostiku i liječenje osteoporoze (226, 227).

Jasno određena definicija i precizno izmjeren BMD omogućio je procjenu prevalencije osteoporoze u različitim populacijama, no s druge strane, budući da je arbitrarno određena i da ne uzima u obzir druge parametre „kvalitete“ kosti koje utječu na lomljivost, u određenom broju osoba s povećanim rizikom prijeloma kosti dijagnoza temeljena na BMD-u je neodgovarajuća. National Osteoporosis Risk Assessment (NORA) studija u SAD-u na približno 150.000 postmenopauzalnih žena bijele rase potvrdila je da samo 82% žena s osteoporotičnim prijelomom ima zadovoljene SZO kriterije za osteoporoze (228), a u Study of Osteoporotic Fractures 54% postmenopauzalnih žena s prijelomom vrata bedrene kosti nema zadovoljene SZO kriterije za osteoporoze (T-vrijednost  $\leq 2,5$ ) (229).

Navedena istraživanja pokazuju da samo mjerenje BMD-a mnoge žene s rizikom prijeloma isključuje iz rizične populacije. Iako je neprijeporna činjenica da rizik prijeloma raste sa smanjenjem koštane gustoće, procjena rizika prijeloma može se poboljšati sagledavanjem svih rizičnih čimbenika. Nekoliko čimbenika rizika prijeloma neovisno je o koštanoj pregradnji, to su: već postojanje (doživljeni) prijeloma, mala tjelesna masa (niski BMI), dugotrajno liječenje glukokortikoidima, obiteljska anamneza prijeloma, pušenje cigareta, alkoholizam i ubrzana pregradnja kosti (230). SZO razvija multivarijantne modele koji uz navedene čimbenike rizika, uzimaju u obzir dob i koštanu gustoću bolesnika, kako bi se što točnije procijenio rizik prijeloma za razdoblje od narednih 10 godina, što opravdava novu strategiju liječenja (231).

## **1.6. Komplikacije osteoporoze**

Osteoporotični prijelom najteža je komplikacija osteoporoze, a nastaje netraumatski i izravna je posljedica male koštane mase. Prijelomi se mogu gotovo uvijek povezati s koštanom gustoćom, a rizik novog prijeloma raste za 2.0 do 2.4 puta za svaku SD smanjenja koštane mase, bez obzira na mjesto mjerenja (232). Prije pojave prijeloma opisuje se gubitak horizontalnih trabekula kralježaka tako da su vertikalne osobito dobro izražene. Duge kosti imaju stanjenu kortikalnu kost i prati ih gubitak spužvaste kosti. Posebne promjene su izražene u bedrenoj kosti i znak su uznapredovale bolesti (48). Prijelomi su najznačajniji čimbenik morbiditeta i mortaliteta, bitno utječu na kvalitetu života i značajno materijalno opterećuju zdravstveni fond s tendencijom progresivnog rasta (233). Veliko kliničko značenje osteoporotičnih prijeloma predstavlja činjenica da postojanje prijeloma svrstava osteoporozu u teži oblik bolesti, tj. s već nastalom komplikacijom, a do tada moguće bez ikakvih simptoma. Kako osteoporoza, tako i učestalost osteoporotskih prijeloma raste s dobi. Nakon 50. godine života raste učestalost prijeloma podlaktice, nakon 60. godine prijeloma kralježaka, a nakon 70. godine prijeloma vrata bedrene kosti. Životni rizik simptomatskog prijeloma za ženu u Velikoj Britaniji u dobi 50 godina za podlakticu iznosi 13%, 11% za kralježak i 14% za vrat bedrene kosti. Odgovarajuća učestalost za muškarca iste dobi iznosi 2%, 2% i 3% (234). Incidencija svih prijeloma je veća i ranije nastaje u žena nego u muškaraca. Budući da je očekivano trajanje života veće u žena, postoji proporcionalno više starijih žena nego muškaraca, što rezultira većom prevalencijom prijeloma među ženama nego što bi se očekivalo prema incidenciji korigiranoj u odnosu na dob. Nastali prijelom značajno



povećava rizik novog prijeloma, tako osobe s postojećim prijelomom kralježka imaju 7-10 puta veći rizik nastanka novog prijeloma (235). Također, rizik prijeloma vrata bedrene kosti je 1,4 puta veći u žena, odnosno 2,7 puta veći u muškaraca, koji su prethodno imali prijelom distalnog dijela podlaktice (236). Značajne su patnje velikog broja bolesnika zbog nastale invalidnosti. Osteoporotični prijelomi kralježaka i vrata bedrene kosti uzrokuju trajne bolove i deformitete lokomotornog sustava, invalidnost, gubitak sposobnosti u svakodnevnim aktivnostima, gubitak samopouzdanja, depresiju i smrt. Oko 50% pacijenata s prijelomom vrata bedrene kosti nikad ne uspije samostalno hodati i 25% zahtjeva trajnu pomoć (237), a smrtnost 5 godina nakon prijeloma je 20% veća od očekivane (238). Kliničke smetnje kao gubitak tjelesne visine, pogrbljenost, visceralne tegobe u smislu otežanog disanja i probavnih tegoba, bolovi u kralježnici, porast invalidnosti i smrtnosti uz značajno smanjenje kvalitete života karakteristike su prijeloma kralježaka. Važan činitelj za nastanak prijeloma su padovi, posebno u starijih osoba, često zbog slabe koordinacije pokreta, usporenih refleksa, smetnji vida, upotrebe psihotropnih lijekova i neuroloških bolesti (239). Samo neki od rizičnih čimbenika za prijelom koje nismo ranije naveli: raniji prijelom u dobi 20 do 50 godina, podatak o prijelomu u obitelji, pušenje cigareta, upalne bolesti crijeva, celijakija, cistična fibroza, ranija hipertireoza, prekomjerno konzumiranje kave, slaba tjelesna aktivnost, niska ili gubitak na tjelesnoj težini (239).

Prijelom kralježka je najčešći osteoporotični prijelom i vrlo je snažan predskazatelj budućih prijeloma svih područja skeleta, no veliki problem je točna procjena njihove učestalosti obzirom da značajan broj prijeloma kralježaka nastaje bez simptoma i ostaje neprepoznat (240). Upotreba morfometrijskih i semikvantitativnih tehnika u velikim epidemiološkim istraživanjima unaprijedila je naše spoznaje o incidenciji i prevalenciji prijeloma kralježaka. Čak 2/3 prijeloma kralježaka klinički se ne otkriva (241), stoga se postranično DXA slikanje kralježnice s ciljem otkrivanja prijeloma (VFA, vertebral fracture assessment) sve češće koristi u slučajevima visoko rizičnih pacijenata (242). Prednosti VFA u odnosu na konvencionalno, radiološko slikanje kralježnice su jednostavnije za pacijenta, mala doza zračenja (manja 300 puta), pouzdano otkrivanje prijeloma (87-95%) i precizno digitalno mjerenje visine kralježaka (243, 244). Otkrivanje neprepoznatih prijeloma kralježaka mijenja dijagnozu bolesti, rizični profil i klinički pristup pacijentu (245).

Prema etničkoj pripadnosti azijske žene imaju manji rizik prijeloma u odnosu na bjelkinje. Rizik prijeloma vrata bedrene kosti značajno je manji u afričkih i američkih žena nego bjelkinja (2). Prosječna mineralna gustoća kosti u azijskih žena je manja nego u bjelkinja zbog slabije konstitucije tijela (246, 247). Mnogi drugi čimbenici, različiti u etničkim

skupinama, djeluju na manju učestalost prijeloma, kao što su viša vršna koštana masa ili slabiji gubitak kosti u menopauzi (248, 249). Čak i kada se naprave korekcije prema veličini tijela i drugim kovarijantama, rizik prijeloma prema gustoći kosti je manji u afričkih i američkih žena u odnosu na bjelkinje (35, 36).

U SAD-u na 44 miliona pacijenata sa slabijom mineralnom gustoćom kosti nalazimo 1,5 milion osteoporotičnih prijeloma svake godine, od kojih je 700.000 prijeloma kralježaka, 300.000 prijeloma vrata bedrene kosti, 250.000 prijeloma podlaktice i 250.000 osteoporotičnih prijeloma drugih dijelova koštanog sustava (250). Izravna potrošnja zbog osteoporotičnih prijeloma u SAD-u iznosila je 17 milijardi dolara tijekom 2005. godine, od toga su prijelomi vrata bedrene kosti činili 14% prijeloma, a 72% troškova (251). Prema rezultatima studije EVOS (European Vertebral Osteoporosis Study) koja je uključivala 15.570 muškaraca i žena u dobi 50-79 godina iz 36 Europskih zemalja, prevalencija deformiteta kralježaka prema morfometrijskim kriterijima iznosila je 12% u oba spola, a također je utvrđena standardizirana stopa prijeloma kralježaka od 16,3% za muškarce, odnosno 14,8% za žene prosječne dobi 60 godina (252). Utvrđena je čvrsta povezanost između pojavnosti deformiteta kralježaka i bolova u leđima, te smanjenja visine (253). Rezultati istraživanja u Rochesteru su potvrdili da je samo 30% prijeloma kralježaka klinički prepoznato (241), dok je u epidemiološkoj studiji provedenoj u Engleskoj i Walesu samo 8% prijeloma kralježaka bilo i klinički dijagnosticirano (254). Navedeni podaci ukazuju da veliki broj starijih muškaraca i žena koji već imaju deformitete kralježaka, a time i povećan rizik od novih prijeloma, ostaju neprepoznati.

Općenito su pouzdaniji podaci koji se odnose na nevertebralne prijelome, npr. vrata bedrene kosti i podlaktice, nego na prijelome kralježaka, koji mogu proći i klinički neprimjetno. Incidencija prijeloma vrata bedrene kosti eksponencijalno raste s dobi, a omjer učestalosti u muškaraca i žena starijih od 50 godina iznosi 1:2 (255). U svijetu je 1990.g. registrirano 1,66 milijuna prijeloma vrata bedrene kosti, najozbiljnijih komplikacija osteoporoze, a procjena da će 2050. godine iznositi oko 6,26 milijuna (146). Epidemiologija prijeloma podlaktice ima drugačiji obrazac od prijeloma kralježaka i vrata bedrene kosti, čija učestalost značajno raste s dobi. Naime, u žena incidencija ovih prijeloma linearno raste od 40. do 65. godine života, nakon čega zadržava stalnu razinu, dok je u muškaraca krivulja incidencije ravna nakon 20. godine života. Incidencija prijeloma nadlaktice, zdjelice, rebara i potkoljenice također raste s dobi, ali je značajno niža od incidencije prijeloma vrata bedrene kosti, kralježaka i podlaktice.

Kao ni u većini zemalja svijeta, tako ni u Hrvatskoj ne postoji jedinstveni sustav registriranja i praćenja oboljelih od osteoporoze, no nekoliko epidemioloških istraživanja daje dobar uvid u učestalost osteoporoze i prijeloma. Epidemiologija osteoporotičnih prijeloma u našoj zemlji analizirana je u sklopu, već spomenutog, istraživanja EVOS. U usporedbi s drugim europskim zemljama prevalencija prijeloma kralježaka u Hrvatskoj bila je relativno visoka. Na temelju tih rezultata procjenjuje se da u Hrvatskoj 90.000 muškaraca i 77.000 žena starijih od 50 godina imaju prijelom kralježka (43). Učestalost osteoporotičnih prijeloma u Hrvatskoj analizirana je prema epidemiološkim podacima u razvijenim zemljama svijeta (146). Uvid u kretanje osteoporoze može se dobiti iz godišnje evidencije o ukupnom broju utvrđenih bolesti. Tijekom 2002.g. u Hrvatskoj su bila 5.794 hospitalizirana bolesnika zbog prijeloma vrata bedrene kosti, a 4.214 je bilo starijih od 65 godina (256). Prema podacima da su  $\frac{3}{4}$  prijeloma vrata bedrene kosti u toj dobi osteoporotični dobije se broj od 3.000 osteoporotičnih prijeloma vrata bedrene kosti godišnje u Hrvatskoj. Prema epidemiološkim studijama u Hrvatskoj se godišnje očekuje još 3.000 osteoporotičnih prijeloma podlaktice, 8.400 osteoporotičnih prijeloma kralježaka i 3.600 drugih nevertebralnih osteoporotičnih prijeloma odnosno ukupno 18.000 osteoporotičnih prijeloma (40). Prema podacima drugih autora prevalencija osoba starijih od 50 godina s prijelomom kralježka iznosi 11,8% (15,8% muškarci i 9,7% žene). Svega 69 od 5.525 (1,24%) analiziranih kralježaka bilo je slomljeno, najčešće u području donjeg torakalnog i gornjeg lumbalnog dijela, a samo 9,6% imalo je dijagnozu osteoporoze (257). U muškaraca dobi 20-99 godina pokazano je da 16,2% muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu prema nalazu QUV-a, te da se vršne vrijednosti koštane mase postižu u trećem desetljeću života (45). Navedeni podaci se dosta razlikuju od objavljenih do sada ! Podaci iz epidemioloških istraživanja pokazuju da je učestalost osteoporoze veća u azijskim zemljama u odnosu na bijelo stanovništvo Europe i Sjeverne Amerike, gdje prevalencija iznosi 10% do 15%. U Hrvatskoj je učestalost slična kao i u drugim europskim zemljama, dok je incidencija osteoporotskih prijeloma nešto veća od europskog prosjeka. Takva neujednačena metodologija čest je razlog otežane usporedbe podataka između pojedinih istraživanja.

## 1.7. TSH I OSTEOPOROZA

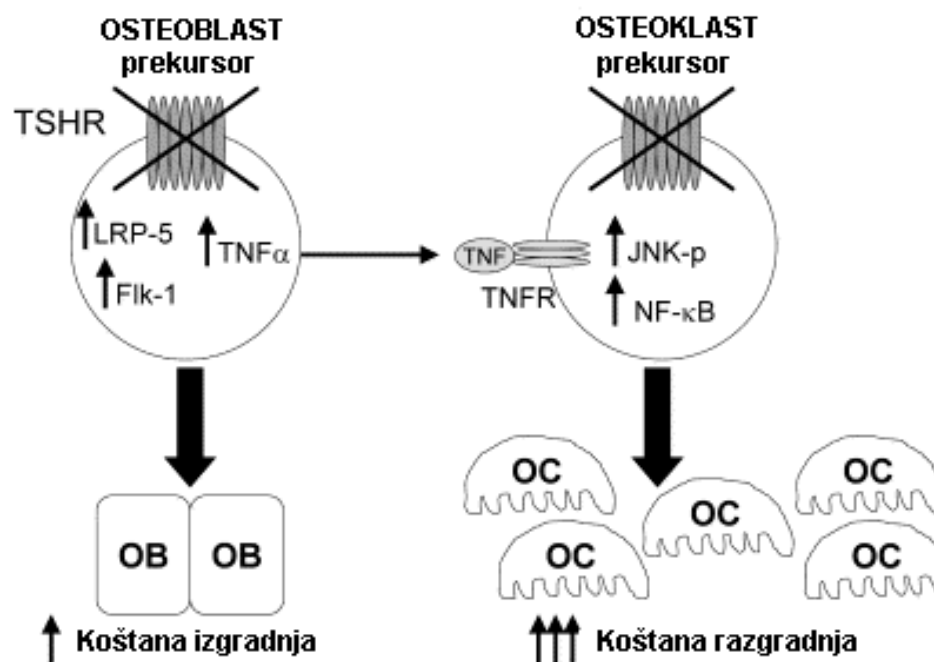
Tireotropin (TSH) je hormon prednjeg režnja hipofize čija je glavna funkcija reguliranje aktivnosti štitnjače. Otkriće G-vezanih TSH receptora (TSH-R) na velikom broju različitih vrsta stanica upućuje na mogućnost da TSH, osim u štitnjači, ima i dodatne, još uvijek nepoznate uloge i funkcije u drugim tkivima (258). Nastanak osteoporoze u bolesnika s hipertireozom tradicionalno se smatra posljedičnim učinkom povišenih hormona štitnjače koji ubrzavaju koštanu pregradnju (aktivnost osteoblasta i osteoklasta) te skraćuje normalni ciklus pregradnje kosti. Trijodtironin (T3) je aktivni oblik hormona štitnjače i važan regulator koštanog razvoja i pregradnje kosti, stoga su se istraživači fokusirali na njegov učinak na koštane stanice putem tireoidnih receptora (TRs). TR $\beta$  su izraženiji u negativnoj feedback kontroli hipotalamus-hipofiza-štitnjače tako da manjak T3 povećava lučenje TSH i hormona štitnjače. Posljedica tireotoksikoze na skelet izražava se pojačanim rastom, ubrzanim starenjem i osteoporozom, učinci uglavnom posredovani putem T3 receptora. Posredstvom TR $\alpha$ 1 i TR $\beta$  inhibira se prenos signala putem Wnt/ $\beta$ -katenina u osteoblastima što uzrokuje osteoporozu u stanju tireotoksikoze (259). Iako osteoklasti imaju TR, čini se da je njihov odgovor posredovan u potpunosti putem osteoblasta. U prisutnosti vitamina D<sub>3</sub>, T3 inducira osteoblaste da stvaraju RANK ligand, ključni osteoklastogeni citokin. Međutim, miševi bez poznate aktivne forme TR pokazuju usporeni rast i sazrijevanje kosti, ali ne pokazuju porast mineralne gustoće kosti što bi bilo očekivano ukoliko je T3 jaki stimulator razgradnje kosti in vivo. Procesi razgradnje i izgradnje koštanog tkiva su povezani u vremenskom i prostornom slijedu što omogućuje održanje mase i cjelovitosti skeleta (260). Hipertireotično stanje u ljudi i životinja pokazuje sličan vremenski nesrazmjer remodeliranja kosti uz značajno veći gubitak koštane mase. Ross i suradnici su objavili da supresivna terapija levotiroksinom dovodi do smanjenja mineralne gustoće podlaktice u premenopauzalnih žena kao posljedica dugotrajne supresije TSH (261), a potom su objavljene brojne proturječne studije. Meta-analiza djelovanja hormona štitnjače i TSH na integritet skeleta u nizu studija unatrag 30-tak godina pokazuje da hipertireoza i upotreba hormona štitnjače u svrhu tireosupresivne terapije, osobito u postmenopauzalnih žena, ima negativno djelovanje na kost. U postmenopauzalnih žena s hipertireozom učestalost prijeloma vrata bedrene kosti 2,5 puta je češća nego u kontrolnoj skupini, suprotno nakon izlaganja levotiroksinu nije uočen povećan rizik od prijeloma kuka (262). Budući da su razine T3 i T4 obrnuto povezane s TSH nije jasno da li na sniženje BMD-a utječe povećanje hormona štitnjače ili smanjene hormona hipofize. Subklinička hipertireoza smanjuje kvalitetu života djelovanjem na psihički, kardiovaskularni i koštani sustav, a

kliničke manifestacije su reverzibilne i mogu se prevenirati (263, 264). Najveći učinak je na kortikalnu kost (DXA mjerenje vrata bedrene kosti i podlaktice), a nadomjesna terapija hormonima štitnjače, ukoliko je TSH u granicama normale, izgleda ima minimalan klinički učinak na skelet (265). Velika studija praćenja 16.249 ispitanika pokazuje da hipertireoza i hipotireoza imaju manji, ali značajno veći rizik od prijeloma (266), dok tri godine nakon izliječenja hipertireoze gustoća kosti je komparabilna s vrijednostima u zdravih (267).

Fiziološki mehanizmi kontrole pregradnje skeleta pomoću hormona štitnjače i TSH tek su nedavno pojašnjeni primjenom genetskih manipulacija. Nije bilo poznato da TSH ima značajnog fiziološkog utjecaja na stanice kosti, a sekundarna osteoporoza u hipertireozi smatrala se, na osnovu in vitro studija, posljedicom povišenih vrijednosti hormona štitnjače (T3 i T4). Istovremeno se povećana koštana masa u hipotireozi smatrala posljedicom usporene koštane pregradnje zbog sniženih vrijednosti hormona štitnjače (268, 269, 270). Pokazano je da isključenjem molekula smatranih neophodnim za stvaranje i razgradnju kosti dobivamo više skeletnih fenotipova. Tako pregradnja skeleta nije prekinuta u miševa s blokiranim  $\alpha_1$  i  $\beta$  receptorima za hormone štitnjače (TR $\alpha_1$  i TR $\beta$ ). Ti miševi ne pokazuju znakove osteoporoze ili porasta koštane mase, naprotiv pokazuju skeletnu morfogenezu i poremećaje rasta ploče, stoga se zaključuje da bi poremećaji koštane mase u hiper i hipotireozi mogli biti pod utjecajem TSH (271). Postoje dokazi da TSH ima izravan učinak na obje komponente koštanog metabolizma, izgradnju (putem osteoblasta) i razgradnju (putem osteoklasta), koji je posredovan TSH-R nađenim na površini prekursora osteoblasta i osteoklasta, in vivo i in vitro. Već 50%-tno smanjenje u ekspresiji TSH-R izaziva jaku osteoporozu (gubitak kosti), te fokalnu osteosklerozu (lokalno stvaranje kosti). Nadalje, smanjenje koštane mase koje se uočava u TSH-R haploinsuficijentnim miševima s normalnim serumskim razinama tireoidnih hormona, upućuje na to da TSH samostalno utječe na koštanu pregradnju (272). U stvari su Abe i sur. pokazali da je TSH negativni regulator skeletne pregradnje. TSH inhibira stvaranje i preživljavanje osteoklasta usporavanjem JNK/c-jun i NF $\kappa$ B (jezgrinog čimbenika  $\kappa$ B) signala stimuliranih djelovanjem RANK-L i TNF- $\alpha$ . TSH također inhibira diferencijaciju osteoblasta i izražaj kolagena tipa 1 u Runx-2 i osterix neovisnom načinu, pomoću smanjenog izražaja Wnt (LRP-5) i VEGF (Flk; fetal liver kinase-1) signala (Slika 1.3.). U normalnih stanica TSH inhibira diferencijaciju prekursora i osteoblasta i osteoklasta. U TSH-R<sup>-/-</sup> miševa ta inhibicija je uklonjena. Prekursori osteoblasta povećavaju LRP-5 i FLK-1, što povećava broj diferenciranih osteoblasta i povećava stvaranje nove kosti. Stvaranje TNF- $\alpha$  u TSH-R<sup>-/-</sup> miševa je povećano, a taj citokin povećava diferencijaciju prekursora osteoklasta (slično kao i RANKL) i dovodi do nesrazmjera

aktivnosti osteoblasta i osteoklasta (uncoupled). Inače osteoblasti djeluju na diferencijaciju osteoklasta in vivo drugim putem, ekspresijom RANKL i faktora stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF) (273). U nedostatku TSH-R, prekursori osteoklasta pokazuju pojačanu diferencijaciju posredovanu RANKL, s porastom fosforilacije JNK (JNK-p) i aktivacije NF- $\kappa$ B. Konačni rezultat je značajan porast zrelih osteoklasta s posljedičnom razgradnjom kosti koja je veća od izgradnje, a miševi s TSH-R<sup>-/-</sup> imaju osteoporozu (274). Ta istraživanja definiraju ulogu TSH kao neovisne molekule u kontroli izgradnje (formacije) i razgradnje (resorpcije) skeleta i to na temelju pokusa izvedenih na miševima sa smanjenom koštanom masom kojima je izbačen gen za TSH receptor (272, 275).

Slika 1.3. Koštana pregradnja je pojačana u nedostatku TSH-R (OB – osteoblast; OC – osteoklast; LRP-5 - low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5; Flk - fetal liver kinase-1; TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$ ; JNK-p i NF- $\kappa$ B – signalne molekule za imunodetekciju).



Hasse i sur. su u prethodnim radovima pokazali da TSH negativno utječe na diferencijaciju osteoklasta, odnosno da heterozigotni i homozigotni TSH-R miševi kojima je izbačena funkcija za TSH-R jesu osteopenični uz povećanu diferencijaciju osteoklasta. Autori pokazuju da dolazi i do pridruženog povećanja vrijednosti TNF- $\alpha$ , ključnog osteoklastogenog citokina što uzrokuje povećanu diferencijaciju osteoklasta. Povećanje u TSHR -/- i TSHR +/- miševa je poremećeno u miševa kojima je izbačena funkcija za receptor TSH i TNF- $\alpha$  istodobno, kao i u heterozigotnih miševa za oba gena. Ta istraživanja su pokazala kako je TNF- $\alpha$  ključni citokin koji posreduje u antiresorptivnom učinku TSH na koštani sustav. TSH izravno inhibira stvaranje TNF- $\alpha$ , smanjuje broj prekursora osteoklasta koji nastaju pod utjecajem TNF- $\alpha$  i oslabljuje indukciju TNF- $\alpha$  aktivnosti pomoću IL-1, TNF- $\alpha$  i receptorskog aktivatora NF $\kappa$ B liganda. TSH isto tako suprimira stvaranje osteoklasta u mišjih makrofaga kao i u RAW-C3 stanica (276). Iste rezultate su dobili Sun i sur., koji dokazuju da TSH inhibira razgradnju kosti pomoću osteoklasta. Miševi haploinsuficijentni za TSH receptor pokazuju smanjenu gustoću kosti i povećanu koštanu razgradnju u prisustvu normalne funkcije štitne žlijezde (277). U ljudi TSH inhibira biljege koštane pregradnje već nakon jednokratne primjene, a niske vrijednosti TSH u serumu koreliraju s povećanim rizikom od prijeloma. Dokaz da niske vrijednosti TSH jesu predisponirajući čimbenik za osteoporozu u bolesnika s hipertireoidizmom ukazuje na veliku ulogu hormona hipofize u koštanoj biologiji (277). U nedavnim istraživanjima u ovarijektomiranih štakora pokazano je da niske doze rekombinantnog TSH sprječavaju gubitak koštane mase bez porasta hormona štitnjače (T3 i T4). Također niske doze TSH popravljaju izgublenu gustoću i volumen kosti, mikroarhitekturu i čvrstoću kosti putem antiresorptivnog i anaboličkog učinka TSH na pregradnju kosti (278). In vitro studije pokazuju da TSH ima inhibitorni učinak na RANKL posredovano stvaranje osteoklasta u kulturama hematopoetskih matičnih stanica. Novije studije potvrđuju različiti učinak hormona štitnjače i TSH na skelet u miševa i ljudi. TSH primjenjen intermitentno u glodavaca tijekom 2 tjedna prevenira gubitak koštane mase i popravljaju kost nakon ovarijektomije. Anabolički učinak nastaje ranije, a inhibitorni učinak na osteoklaste perzistira čak nakon 4 tjedna od prekida liječenja (279). Nasuprot tome gubitak funkcije TSH-R, npr. u kongenitalnom hipotireoidizmu, aktivira diferencijaciju osteoklasta, potvrđujući ključnom ulogu TSH-R u regulaciji koštane pregradnje. Obzirom na inhibitorno djelovanje TSH na koštanu pregradnju, pretpostavlja se da bi mogao biti novi lijek za liječenje postmenopauzalne osteoporoze (280).

Navedena istraživanja potvrđuje nekoliko do sada objavljenih kliničkih studija. U starijih bolesnica s pojačanom funkcijom štitnjače pokazano je da su niske vrijednosti TSH

jedini čimbenik rizika za osteoporotični prijelom kralježka (4x) i vrata bedrene kosti (3x) u odnosu na žene s normalnim vrijednostima TSH. Pretpostavlja se da je niska serumska vrijednost TSH, nastala bilo zbog patološkog hipertireoidizma ili zbog terapije tireoidnim hormonima, odgovorna za povećani rizik prijeloma vrata bedrene kosti i kralježnice u osteoporotičnih žena starijih od 65 godina (281, 282). Autori su zaključili da žene starije od 65 godina s niskim vrijednostima TSH (fiziološki hipertireoidizam ili tireosupresivna terapija), imaju povećan rizik za nove prijelome kralježaka, vrata bedrene kosti i podlaktice te za smanjenu gustoću kosti kod zdravih žena u postmenopauzi. Primjena hormona štitnjače uz normalne vrijednosti TSH ili liječenje hipertireoidizma tireostatskim lijekovima ne povisuje rizik prijeloma kosti (282).

U jednoj „posthoc“ analizi FIT studije (Fracture Intervention trial) Jamal i sur. su istraživali kliničku vrijednost laboratorijskih testova u žena s osteoporozom. Prevalencija patoloških nalaza u žena s osteoporozom u usporedbi sa ženama bez koštane bolesti razlikovala se samo za vrijednosti niskog TSH ( $<0.5$  IU/ml). Između žena sa i bez osteoporoze na vratu bedrene kosti prevalencija niskog TSH bila je 4.9% i 3.7% tj. pozitivan omjer 1.2, a u žena s prijelomom kralježka u usporedbi sa ženama bez prijeloma s pozitivnim omjerom od 1.4 (283).

U žena kontroliranih zbog karcinoma štitnjače na tireosupresivnoj terapiji s niskim vrijednostima serumskog TSH, kratkotrajna stimulacija s rekombinantnim TSH (rhTSH), već nakon 2 dana, uzrokuje značajno smanjenje serumskog C-telopeptida tipa 1 kolagena (CTXs) i porast serumske koštane alkalne fosfataze (BAP) bez učinka na stvaranje osteoprotegerina (OPG). Inhibicijski učinak TSH na razgradnju kosti nađen je samo u postmenopauzalnih žena koje imaju malu koštanu masu i povećanu pregradnju kosti kao posljedicu supresivne terapije levotiroksinom (284). Tjedan dana nakon primjene TSH vrijednosti C-telopeptida su smanjene na početne vrijednosti, dok su vrijednosti BAP-a ostale visoke. Istraživanje je pokazalo da je subklinička tireotoksikoza udružena s povećanom koštanom pregradnje i povišenim vrijednostima OPG-a, a jednokratno povećanje serumskih vrijednosti TSH (rhTSH) dovodi do reverzibilne inhibicije koštane razgradnje.

Također je pokazano da nisko normalni TSH (0,5-1,1 mIU/L) u postmenopauzalnih žena ne bi trebao biti fiziološki jer se nalazi značajno veći rizik za osteoporozu (2,2 puta) nego u postmenopauzalnih žena s visoko normalnim TSH (2,8-5 mIU/L) (285). Kratkotrajna primjena visokih vrijednosti levotiroksina (LT4; 300 µg tijekom 3 tjedna) u mladih muškaraca smanjila je TSH na gotovo nemjerljive vrijednosti uz značajno veći porast biljega koštane razgradnje nego biljega koštane izgradnje (286).



Nije poznato kako se TSH prenosi u serumu do štitnjače i receptora u kostima. Pokazano je da miševi kojima je izbačen gen za transtiretin imaju, osim smanjene količine vitamina A u serumu i bitno smanjenu količinu T4 u serumu (287). Postoji mogućnost da se hormoni štitnjače u serumu vežu osim za specifične globuline i za transtiretin. U ovom radu namjeravamo istražiti djelovanje egzogenog i endogenog TSH na biljege koštane pregradnje i mineralnu gustoću kosti u životinjskom i humanom modelu osteoporoze, tj. otkriti postoji li mogućnost da TSH djeluje na kost i da istovremeno ne povećava vrijednosti hormona štitnjače u serumu.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja su pokazati postoji li utjecaj TSH na koštanu pregradnje i to:

- 1) Pokazati utječu li sistemski primijenjen humani rTSH na pokazatelje koštane pregradnje i na volumen kosti u modelu ovarijektomiranih štakora.
- 2) Objasniti mehanizme djelovanja rTSH na skelet u koncentraciji koja još ne utječe na porast koncentracije hormona štitnjače u serumu.
- 3) Pokazati je li nisko normalni TSH rizični čimbenik za osteoporozu i osteoporotični prijelom u postmenopauzalnih žena.
- 4) U bolesnica bez štitne žlijezde ispitati utječu li vrlo visoke ili niske promjene endogenog TSH na pokazatelje koštane pregradnje.
- 5) U bolesnica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti ispitati utječu li cikličke promjene endogenog TSH na pokazatelje koštane pregradnje.

Predložena istraživanja ukazati će na mogućnost korištenja TSH u liječenju osteoporoze, kao i drugih metaboličkih bolesti kosti sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti. Danas postoji više antiresorptivnih skupina lijekova, kao što su estrogen, SERM-ovi i bisfosfonati. Od anaboličkih lijekova na tržištu je u primjeni samo paratireoidni hormon koji, osim što je veoma skup, primjenjuje se potkožnim injekcijama i uzrokuje osteosarkom u štakora što je i označeno crnim slovima na bočici za bolesnike. Potreba za novim anaboličkim lijekovima za liječenje osteoporoze je velika. Rekombinantni TSH se već primjenjuje u kliničkoj medicini u svrhu dijagnosticiranja metastaza u bolesnika s karcinomom štitnjače što će eventualno znatno olakšati pretklinička i klinička ispitivanja TSH kao lijeka za liječenje

bolesnika sa smanjenom gustoćom kosti s posebnim osvrtom na bolesnike koji boluju od osteoporoze i kojima je odstranjena štitna žlijezda (400.000 bolesnika u Europi i u USA).

U Republici Hrvatskoj nije bilo sličnog kliničkog istraživanja, a neki protokoli nisu još niti opisani u literaturi. Međutim, Laboratorij za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu godinama se bavi proučavanjem mehanizama koštane i hrskavične regeneracije. Prema tome, otkrivanje TSH kao nove molekule koja sudjeluje u koštanoj pregradnji pridonijeti će razumijevanju odnosa koštanog stvaranja i razgradnje.

### 3. HIPOTEZE

U nedavnim istraživanjima (in vitro, te in vivo na životinjskim modelima) pokazano je da tireotropin (TSH) ima inhibitorno djelovanje na pregradnju kosti. TSH neposredno djeluje na stvaranje i razgradnju kosti putem TSH-R nađenih na prekursorima osteoblasta i osteoklasta. U ovom istraživanju pokušati ćemo dokazati učinak i mehanizam djelovanja TSH na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze i u postmenopauzalnih žena sa smanjenom mineralnog gustoćom kosti. Zbog učinka TSH na izlučivanje hormona štitne žlijezde, bitno je utvrditi postoji li koncentracija TSH koja učinkovito potiče stvaranje kosti, a da ne utječe na pojačano izlučivanje hormona štitne žlijezde zbog posljedične hipertireoze. Iz populacije žena s postmenopauzalnom osteoporozom usporediti ćemo odnos TSH i mineralne gustoće kosti, te analizirati korelaciju serumske razine TSH i učestalosti osteoporotičnih prijeloma kralješaka. U ovom radu također ćemo istražiti utjecaj endogenog TSH na serumske pokazatelje koštane pregradnje u bolesnika u kojih je izvršena tireoidektomija radi diferenciranog karcinoma štitnjače. U bolesnika na tireosupresivnoj terapiji ili u razdoblju kada je bolesnik bez nadomjesne terapije, pratiti ćemo utjecaj ekstremnih vrijednosti TSH na serumske pokazatelje koštane pregradnje. Promjene koštanih biljega nakon jednokratne stimulacije TSH pomoću TRH testa analizirat ćemo u postmenopauzalnih žena s osteoporozom.

Temeljne hipoteze ovog istraživanja jesu:

- 1) Sistemski primijenjen rekombinantni TSH (rTSH) utječe na koštanu pregradnju i volumen kosti u štakora s osteoporozom.
- 2) rTSH djeluje na koštanu pregradnju na način da istodobno ne mijenja koncentraciju hormona štitnjače u serumu.
- 3) Nisko normalni TSH je rizični čimbenik za osteoporozu u postmenopauzalnih žena
- 4) Cikličke promjene endogenog TSH utječu na specifične pokazatelje koštane pregradnje u bolesnica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti.

Ukoliko rezultati istraživanja ukažu da minimalne količine egzogenog TSH ne utječu na hormone štitnjače, a neposredno povećavaju koštanu masu u štakora, TSH će postati nova mogućnost liječenja bolesnika sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti. Tu mogućnost dodatno ćemo potvrditi ukoliko dokažemo da povećanje i smanjenje serumskih vrijednosti endogenog TSH utječe na pokazatelje koštane pregradnje u ljudi.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Učinak cikličke primjene humanog TSH u sprječavanju gubitka kosti u pokusima na životinjama

Primjenom modela štakora s osteoporozom utvrdili smo neposredni učinak cikličke primjene različitih doza egzogenog TSH na koštane parametre izgradnje i razgradnje, te periferne hormone štitnjače u Sprague Dawley štakora starosti 4 mjeseca.

#### Životinje i protokol studije

U studiju je uključeno šezdeset Sprague-Dawley ženki štakora starih 4 mjeseca, težine oko 300 g. Životinje su tijekom pokusa bile smještene u kavezima dimenzija 20x32x20 cm pod standardnim uvjetima (24<sup>0</sup>C, ciklus 12 sati svjetla i 12 sati mraka). Sve životinje imale su slobodan pristup vodi i peletiranoj komercijalnoj hrani (4 RF 21, Mucedola, Italija) koja sadrži 0,916% kalcija, 0,76% fosfora i 1,26 kIU vitamina D3 po kilogramu. Životinje su 14-tog i 4-tog dana dobile zeleno obilježen kalcein (10 mg/kg i.p.), što će dovesti do taloženja duplih fluorokrom oznaka na površinama i obilježavanja aktivnog formiranja kosti.

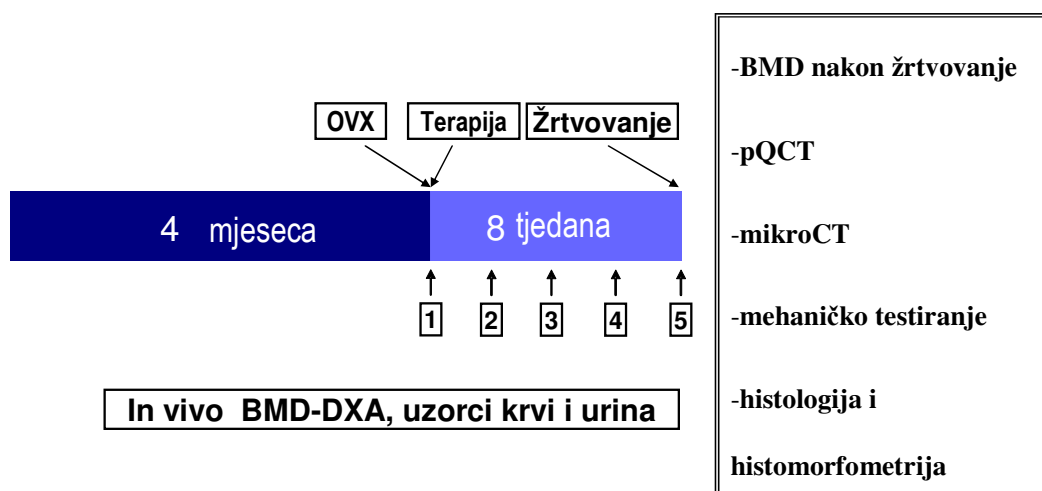
Dvanaest je životinja podvrgnuto lažnoj operaciji (sham), dok je četrdeset osam bilo obostrano ovarijektomirano (OVX) abdominalnim pristupom. Dvanaest štakora je primalo samo placebo otopinu intravenski (nosač), a tri skupine po 12 štakora su primali različite doze humanog TSH (u dozama 0,7, 7 i 70 µg dnevno) odmah nakon ovarijektomije, kako slijedi:

1. SHAM (n=12)
2. OVX + nosač dnevno (n=12)
3. OVX + TSH 0,7 µg dnevno (n=12)
4. OVX + TSH 7 µg dnevno (n=12)
5. OVX + TSH 70 µg dnevno (n=12)

Životinje su primale TSH intraperitonealno tijekom 8 tjedana pri čemu je u vremenskim razmacima od 2 tjedna *in vivo* izmjerena mineralna gustoća kosti (BMD) i

prikupljena krv punkcijom retroorbitalnog venskog spleta, a u serumu su određeni T3, T4 i biljezi pregradnje kosti osteokalcin (OC) i C-telopeptid kolagena tipa 1 (CTX) (Slika 4.1.).

Slika 4.1. Terapijski protokol učinka humanog TSH na pregradnju kosti



### Denzitometrija kosti

Mjerenje mineralne gustoće kosti (BMD) denzitometrijom učinili smo *in vivo* i *ex vivo*. U razmacima od po 2 tjedna životinjama je skenirano koštano područje cijelog tijela te izmjeren mineralni sadržaj i gustoća kosti pomoću dvoenergijske rendgenske denzitometrije (DXA, Hologic QDR-4000, Waltham, Massachusetts, SAD). Na kraju pokusa životinje su bile anestezirane, izvagane i žrtvovane. Stražnje okrajine i slabinska kralježnica su odstranjeni i fiksirani u 70 postotnom etanolu. Desni femur i tibija te slabinska kralježnica (L1 do L5) su upotrebljene za određivanje mineralnog sadržaja i gustoće kosti pomoću DXA-e opremljene softverom za regionalno skeniranje visoke razlučivosti. Veličina polja skeniranja je 5.08 x 1.902 cm, razlučivosti 0.0254 x 0.0127 cm i brzina 7.25 mm/s. Slike dobivene skeniranjem su analizirane i utvrdila se veličina područja kosti, sadržaj minerala kosti i gustoća cijelih kosti,

proksimalnih i distalnih metafiza, te dijafiza vrata bedrene kosti i tibija. Koeficijenti varijacije bili su 0.61% za stražnje okrajine i 1.2% za slabinsku kralježnicu.

### **Periferna kvantitativna kompjutorizirana tomografija (pQCT)**

Izolirane bedrene kosti skenirali smo pomoću periferne kvantitativne kompjutorizirane tomografije (pQCT) rendgenskog aparata (Stratec XCT Research M; Norland Medical Systems, Fort Atkinson, Wisconsin, SAD) uz pomoć softvera verzije 5.04. Volumen, gustoća, ukupno područje kosti, područje spužvaste i kortikalne kosti određeni su kao što je detaljno opisano u uputama za upotrebu stroja kao i u literaturi (288, 289). Koeficijent varijacije bio je 2.5 %.

### **Mikrokompjutorizirana tomografija ( $\mu$ CT)**

U pokusima je korišten uređaj za mikrokompjutoriziranu tomografiju ( $\mu$ CT 40) s pripadajućim softverom od tvrtke SCANCO Medical AG (Bassersdorf, Switzerland) (290). Distalni krajevi bedrene kosti skenirani su u 250 rezova razmaknutih 13  $\mu$ m u dorzoventralnom smjeru kao što je opisano u literaturi (291). Provedena je trodimenzionalna rekonstrukcija kosti pomoću triangulacijskog algoritma. Volumen spužvaste kosti (BV,  $\text{mm}^3$ ), broj trabekula (Tb. N, 1/mm), debljina trabekula (Tb. Th,  $\mu$ m) i trabekularni razmak (Tb. Sp,  $\mu$ m), su izmjereni izravno na trodimenzionalnim snimkama pomoću metode opisane u Hildebrand i sur. (292). Činitelj oblika trabekularne kosti (TbP<sub>f</sub>-trabecular bone pattern factor) i indeks strukturalnog modela (SMI) određeni su pomoću kompjutorskog softvera koji je dio programa  $\mu$ CT uređaja (293, 294). Koeficijent varijacije bio je 0.9%. Radiološka snimanja i analize provedene su u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (DXA), a pQCT i  $\mu$ CT u Edinburgu zahvaljujući prof.dr. Stuartu Ralstonu i doc.dr. Petri Šimić.

### **Histologija i histomorfometrija**

Svim životinjama je potkožno injiciran fluorokrom kalcein u količini od 10 mg/kg (Sigma, Chemical, St. Louis, MO, SAD) 14 i 4 dana prije žrtvovanja. Bedrene kosti su potom izdvojene i očišćene od mekih tkiva, fiksirane u 70% etanolu i uklopljene u metilmetakrilat, izrezani su histološki preparati za histomorfometrijsku analizu i kvantificirani pomoću

kompjutorskog sistema za analizu histoloških preparata (Bioquant II, R and M Biometrics, Nashville, TN, SAD) kao što je opisano u literaturi (295, 296, 297). Statistička analiza je učinjena pomoću StatView 4.0 programa (Abacus Concepts, Berkeley, CA, SAD). Svi odstranjeni organi radi histološke analize, uklopljeni su u parafin, narezani na 10 µm debele rezove, te obojani hemalaun-eozinom i toluidin plavom kako bi se otkrili terapijski štetni učinci. Histološki preparati su analizirani u Laboratoriju za histopatologiju Genzyme Corporation (Framingham, MA, SAD) zahvalnošću dr. Sussan Ryan.

### **Biokemijski pokazatelji u krvi i mokraći**

Kako bi prikupili uzorke urina, životinje su preko noći u vremenskom periodu od 18 sati i bez hrane bile smještene u metaboličke kaveze. Krv je izvađena iz orbitalnog pleksusa. Krv i urin se prikupljala na početku terapije te svaka dva tjedna tijekom 8 tjedana primanja štakorskog TSH intraperitonealno. Stvaranje koštanog seruma i biljega razgradnje je mjereno pomoću komercijalno dostupnih kitova. Koncentracija OC u serumu je izmjerena ELISA-om pomoću EIA kitova za štakorski osteokalcin (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, SAD). Koncentracija CTXs je izmjerena ELISA-om pomoću kitova RatLaps ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Danska). Najniža razina vrijednosti OC i CTXs koju je bilo moguće izmjeriti iznosila je 1 ng/ml i 2 ng/ml. Serumske vrijednosti T3 i T4 hormona štitne žlijezde izmjerene su pomoću vremenskog fluoroimunoeseja (Delfia Wallac, Finska) koristeći upute proizvođača.

### **Biomehaničko određivanje čvrstoće kosti**

Za biomehaničko ispitivanje kosti koristili smo sustav Model 810 (MTS-Systems Corp., SAD). Dvije vrste mehaničkog testiranja provedene su na izdvojenim uzorcima bedrenih kostiju. Test savijanja u tri točke dijafize bedrene kosti upotrijebili smo za određivanje mehaničkih značajki središnjeg dijela dijafize bedrene kosti. Središnji dio bedrene kosti podvrgnuli smo testu savijanja u 3 točke do prijeloma upotrebom brzine pomaka od 0.1 mm/sec uporabom opterećenja od 2.5 kN (MTS Model 661, 14A-0.3), kao što je prethodno opisano u postupku Turner i Burr (298). Maksimalno opterećenje i krtost su očitani iz krivulje opterećenja i pomaka. Za određivanje mehaničkih značajki spužvaste kosti u koštanom kanalu upotrijebili smo test utisnuća metafize distalnog dijela bedrene kosti kao što je prethodno opisano u literaturi (299, 300).

## **Statistička analiza**

Podaci su prikazani tablično i grafički. Raspodjela kvantitativnih vrijednosti je testirana na normalizaciju Kolmogorov-Smirnovim testom; te ako su zadovoljeni uvjeti, analizirani primjenom algoritma ANOVA s jednostranim Dunnett-t post hoc testom uključujući ovarijektomirane i kontrolne životinje! Serumski parametri analizirani su uporabom parnog t-testa.

## **Žrtvovanje**

Žrtvovanje je provedeno 8 tjedana nakon početka terapije u slijedećoj anesteziji: Rompun 5 mg/kg i.m. + Ketamin 35 mg/kg i.m. + T61 0,3 ml/kg intrapulmonalno. Kostu su pripremljene za histologiju.

Za brigu i rad sa životinjama zahvalni smo gospođici Mirjani Palčić, a za izradu preparata, uzimanju uzoraka i testiranja gospođi Đurđici Car. Znanstveni novak, dr. med. Nataša Drača pomogla je u pretkliničkom dijelu pokusa.

### **4.2. Određivanje serumskih vrijednosti TSH i BMD u postmenopauzalnih pacijentica s osteoporozom i prijelomom kralježka**

Protokol se koristio za analizu korelacije vrijednosti TSH prema vrijednosti BMD-a te pojavnosti i učestalosti vertebralnih prijeloma u postmenopauzalnih pacijentica s osteoporozom. U ispitivanoj populaciji sudjelovalo je 940 postmenopauzalnih žena u kojih je mineralna gustoća kosti mjerena u razdoblju od 2000. do 2003.g. pomoću kvantitativnog ultrazvučnog aparata (QUZV) za mjerenje gustoće petne kosti (Sahara) u sklopu aktivnosti Hrvatskog društva za osteoporozu i projekta «Prevenција, dijagnostika i liječenje osteoporoze» s ciljem ranog otkrivanja bolesti te Hrvatskog društva za kalcificirana tkiva i projekta stvaranja centralnog registra pacijenata.

Hrvatsko društvo za osteoporozu i Hrvatsko društvo za kalcificirana tkiva su udruge građana i liječnika s misijom unapređenja i promicanja znanja o osteoporozi, praćenja i izvještavanja o najnovijim dostignućima u prevenciji, dijagnostici i liječenju osteoporoze, te



provođenju prevencije i ranog otkrivanje bolesti u Hrvatskoj. Zahvaljujući sponzorstvima različitih projekata od strane Ureda Vlade Republike Hrvatske zaduženog za rad s neprofitnim udrugama i Ureda za zdravstvo, rad, socijalnu skrb i branitelje Grada Zagreba, koji još uvijek sponzorira navedene aktivnosti s ciljem prevencije bolesti starije populacije u Zagrebu. U domovima zdravlja grada Zagreba, kao i u tijeku terenskih mjerenja mineralne gustoće petne kosti u žena visokog rizika tj. postmenopauzalne dobi s visokim rizikom za osteoporozu prema Smjernicama za dijagnostiku, prevenciju i liječenje osteoporoze (136). Pacijentice u kojih su izmjerene niske vrijednosti BMD-a petne kosti upućivane su u jedan od Centara za osteoporozu Klinika zagrebačkih bolnica (Klinički bolnički centar Zagreb, Klinička bolnica Dubrava, Opća bolnica Sveti Duh) gdje je dodatnim testiranjem potvrđena ili isključena osteoporoza. Dodatno ispitivanje uključivalo je mjerenje tjelesne težine (TT) i tjelesne visine (TV), precizno mjerenje mineralne gustoće kosti na DXA aparatu tipa Hologic, rendgensko snimanje grudne i slabinske kralježnice u svrhu otkrivanja osteoporotičnih prijeloma kralježaka, analizu krvi i urina, hormone štitnjače i TSH u svrhu isključenja bolesti štitnjače te otkrivanja drugih metaboličkih bolesti, ginekološki i opći internistički pregled. Osigurani su osnovni demografski podaci, uzeta je detaljna anamneza i proučena ranija medicinska dokumentacija, a liječnički pregled je provodio specijalista za osteoporozu u Centru za osteoporozu. Svi relevantni podaci upisani su u povijest bolesti, a uključivali su sve bolesti i lijekove koji bi mogli utjecati na gubitak mineralne gustoće kosti, tj. osteoporozu. Istraživanje je odobreno od strane centralnog etičkog povjerenstva Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske i nadležnih etičkih povjerenstava navedenih bolnica. Svim ženama je objašnjena svrha i cilj istraživanja, koje su njihove prednosti u sklopu obrade i liječenja kao i rizici svakog sudionika, obrada je za njih bila besplatna i sudjelovanje je bilo dobrovoljno što su potvrdile potpisom informiranog pristanka koji se čuva u arhivi kliničkih Centara.

Uključujući kriteriji za istraživanje bili su raspon dobi 60-80 godina, najmanje 5 godina postmenopauze i najmanje 5 godina očekivanog trajanja života. Laboratorijski nalazi, uključujući vrijednosti perifernih hormona štitnjače i TSH, nisu smjeli odstupati više od 25% od gornje i donje granice normale. Uredan ginekološki nalaz (uključujući i PAPA test) i uredna mamografija nisu smjeli biti stariji od 6 mjeseci. Isključujući kriteriji bili su prijelomi ili proteze oba kuka, podatak o prijelomu kosti unatrag 12 mjeseci, više od 3 radiološki potvrđena osteoporotična prijeloma kralježka, BMD u ispitivanim područjima manji od -4.5, indeks tjelesne mase (BMI) veći od 32, poznati karcinom dojke ili cerviksa, karcinom ili hiperplazija endometrija, vaginalno krvarenje ili «mrljanje» unatrag godinu dana, maligna

bolest unatrag godinu dana (s izuzetkom karcinoma bazalnih stanica), tromboembolijska bolest (tromboza dubokih vena – DVT, plućna embolija – PE ili tromboza retinalnih vena – RVT), anamnestički podatak o spontanom površinskom tromboflebitisu unatrag 5 godina, uzimanje lijekova u istraživanju tijekom zadnjih 30 dana. Isključujuće su bile Pagetova bolest, osteogenesis imperfecta i bolest koštane srži, poremećaj metabolizma kalcija ili minerala, malapsorpcija, hiper ili hipokalcijemija, aktivni hiper ili hipoparatiroidizam, hiper ili hipotireoza, bubrežna, jetrena ili srčana slabost, kronični alkoholizam, bolest ovisnosti ili oslabljena mentalna funkcija, hiperkalcijurija s aktivnim bubrežnim kamencima, srčana ishemija ili infarkt miokarda unatrag 6 mjeseci, fibrilacija atriya koja zahtjeva liječenje antikoagulansima, kirurški zahvati koji zahtjevaju hospitalizaciju. Pacijentice nisu smjele uzimati bilo kada u prošlosti lijekove kao što su tamoxifen, levormeloxifen, idoxifen, droloxifen i toremifen. Unatrag 2 godine nisu smjele uzimati dulje od mjesec dana bisfosfonate, paratiroidni hormon ili fluorid. Zadnja 3 mjeseca nisu smjele uzimati estrogene, kombinaciju estrogena, inhalacijski ili potkožni kalcitonin, tibolon ili raloxifen. Također nisu smjele uzimati glukokortikoide ili slične kortikosteroide tijekom 3 mjeseca unatrag godinu dana, heparin ili antikoagulantnu terapiju (osim Aspirina i antiagregacije) te sistemske imunosupresive, ili aktualno antipsihotike i antikonvulzive. Navedenim uvjetima bile su isključene sve poznate metaboličke bolesti i stanja koja su mogla utjecati na pogoršanje mineralne gustoće kosti tj. izazvati sekundarnu osteoporozu.

## Mjerenje

Prema svjetskim standardima BMD je određen u području lumbalne kralježnice (antero-posteriorni smjer) i vrata bedrene kosti upotrebom dvoenergetske rendgenske apsorpciometrije (Hologic Delphi, Waldham, MA, SAD). Preciznost mjerenja mineralne gustoće kosti «in vivo» iznosila je 0.8% za područje lumbalne kralježnice i 1.2 % za područje vrata bedrene kosti. Osteoporozu je definirana, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, kao T vrijednost -2.5 i niže u području prosjeka L1-L4 kralježka (engl. lumbal spine, LS ili L1-L4) i vrata bedrene kosti (engl. femoral neck ili samo Neck). Uzorci krvi i urina uzimani su natašte i analizirani u laboratoriju, a TSH vrijednost je mjerena mikroenzimimunoesejom (MEIA) metodom s lokalnim referentnim vrijednostima testa za TSH od 0.3 do 5.5 mIU/L (AxSYM ultrasenzitivni hTSH II, Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, SAD). Podjela TSH vrijednosti (5 skupina, semikvintile) definirana je prema kliničkim vrijednostima arbitrarno prema prethodno publiciranim radovima (285) na taj način da postoji

više skupina u području normalnih TSH vrijednostima kako bi statistička analiza bila što pouzdanija. Značajno je više podskupina selekcionirano u području nisko normalnih TSH vrijednosti, tako da prve tri skupine (od 0,3-1,0 mIU/L; zatim 1,01-1,5 mIU/L i od 1,51-2,0 mIU/L) praktično čine donju trećinu normalnih TSH vrijednosti. Ako im se doda i četvrta skupina (od 2,01-2,7 mIU/L) u analizi dobijamo donju polovinu (50%) normalnih TSH vrijednosti, a 5. skupina sama čini gornju polovinu normalnih TSH vrijednosti (od 2,71 do 5,5 mIU/L). Pojedinačne skupine su bile pacijentice s hipertireozom tj. vrijednosti TSH niže od donje granice normale ( $<0,3$  mIU/L) i pacijentice s hipotireozom tj. vrijednosti TSH više od gornje granice normale ( $>5,5$  mIU/L).

### **Radiološka analiza**

Dijagnozu osteoporoze moguće je postaviti klinički, DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti i radiološki. Radiološki je to moguće na nekoliko načina: klasičnom radiološkom obradom, CT, MR koštanom denzitometrijom, QCT, QUZV, QMR. Klasična radiološka obrada ima velike zamjerke zbog osjetljivosti, jer se smatra da nedostatak veći od 30% mineralnog sadržaja kosti tek postaje radiološki prepoznatljiv. Prednost klasične radiološke obrade je što se veličina prijeloma određuje i prati vizualnom procjenom smanjenja visine trupa i morfološkim promjenama izgleda kralježaka, te deformitetima kralježnice. QCT mjeri promjene lumbalne kralježnice, kuka i podlaktice na osnovu volumetričke gustoće ( $\text{g/cm}^3$ ). Metoda je za dijagnostiku i praćenje osjetljivija od DXA, sporija je od DXA, ali može izravno mjeriti trabekularni koštani gubitak u centralnom dijelu kralježka. Mjerenje je trodimenzionalno volumetrijsko. Doza zračenja je bitno veća nego kod DXA mjerenja. QUZV mjeri petnu kost, patelu i tibiju. Mjeri se brzina i atenuacija širokopojasnog ultrazvuka. Metoda je jednostavna, brza i ekonomična, dobra za određivanje rizika prijeloma i vrlo pogodna za probir pacijentica u rizičnoj populaciji. Uređaj je transportabilan i ne koristi ionizirajuće zračenje. U klasičnoj radiološkoj obradi smo koristili semikvantitativnu metodu po Genantu (301). Metodom smo odredili veličinu prijeloma vizualnom procjenom na osnovu smanjenja visine trupa od Th4 do L5 kralježka.

Stupnjevani su kako slijedi:

- 0. stupanj: - normalni nalaz
- 0,5 stupanj: - opisuje granični deformitet kralježka, promjena koja ne pripada 1. stupnju

1. stupanj: - 20 do 25% redukcije ant., med., i/ili post. dijela trupa kralježka;  
- 10-20% redukcije visine cijelog trupa
2. stupanj: - 25 do 40 % redukcije visine ant., med., i/ili post. visine trupa;  
- 20-40% redukcije visine cijelog trupa
3. stupanj: - 40% i više redukcije visine ant., med., i/ili post visine trupa;  
- 40% redukcije visine cijelog trupa

### **Statistička analiza**

Baza podataka je pohranjena u profesionalnom programu (Microsoft Excel 2003) i obrađivana profesionalnim statističkim programima (Excel i Statistica). Podaci su prikazani kao medijan i raspon vrijednosti. Vrijednosti TSH testirane su pomoću Smirnov-Kolmogorov testa i prikazana je statistička značajnost regresije od normalne distribucije. Analiza multiple regresije je korištena za ispitivanje međuodnosa logaritamskih vrijednosti TSH i BMD prilagođenih dobi i indeksu tjelesne mase. Međuodnos T vrijednosti (lumbalne kralježnice i vrata bedrene kosti) je ispitivana pomoću Spearman rank korelacije. Odnos između serumskih TSH vrijednosti je grupiran u odnosu na granične T vrijednosti vrata lumbalne kralježnice i vrata bedrene kosti te analiziran pomoću  $\chi^2$  testa. Pojedine različite podskupine TSH vrijednosti u odnosu na T vrijednosti su prikazane grafički upotrebom točkastih dijagrama. Statistička analiza je provedena pomoću programa STATISTICA (ver. 7.1; StartSorf, Inc.) s razinom statističke značajnosti  $\alpha=0.05$ . Analiza je prilagođena dobi, godinama nakon menopauze i indeksu tjelesne mase. Analiza kovarijance (ANCOVA) je upotrebljena za objašnjenje odnosa između vrijednosti TSH i BMD-a. Logistička analiza regresije upotrijebljena je za procjenu međuodnosa pojedinih vrijednosti i osteoporoze definirane pomoću T vrijednosti.

#### **4.3. Određivanje učinkovitosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje i periferne hormone štitnjače u postmenopauzalnih žena**

Ovim je istraživanjem analizirana uloga endogenog TSH na biljege koštane pregradnje u žena s postmenopauzalnom osteoporozom.

## Ispitanici

Uključujući kriterij za istraživanje bili su ženska populacija općeg dobrog stanja koje omogućava učestaliji dolazak na kontrole, isključenje svih bolesti unatrag 5 godina koje bi mogle utjecati na mineralni status kosti te poremećaj biljega koštane pregradnje (osim eutireoidnih bolesnica s izliječenim karcinomom štitnjače za protokole C1 i C2), opći laboratorijski nalazi (osobito kalcij, fosfat i alkalna fosfataza), uključujući vrijednosti perifernih hormona štitnjače i TSH koji su bili uredni (Tablica 4.1.) ili nisu odstupali od očekivanih u slučaju kontrole uspješno operiranih pacijentica zbog karcinoma štitnjače, a koje su u vrijeme operacije imale uredne vrijednosti hormona štitnjače i TSH. Isključujući kriteriji bili su svježi prijelomi kosti i proteze oba kuka, podatak o prijelomu kosti unatrag 12 mjeseci, BMI veći od 32, poznata maligna bolest unatrag 10 godina ili liječenje od maligne bolesti unatrag 5 godina (s izuzetkom karcinoma bazalnih stanica i karcinoma štitnjače), primjena heparinske ili antikoagulantne terapije (osim acetilsalicilata i antiagregacije), primjena lijekova koji utječu na pregradnju kosti (npr. kemoterapija, kortikosteroidi, hormonsko nadomjesno liječenje, sistemski imunosupresivi, antipsihotici, antikonvulzivi i sl.) ili imunološki sustav, osim supresivne terapije levotiroksinom u bolesnica s operiranim karcinomom štitnjače za protokole C1 i C2, zatim uzimanje lijekova u nekom drugom istraživanju. Isključujuće bolesti bile su recidiv ili rezidua karcinoma štitnjače, Pagetova bolest, osteogenesis imperfecta i bolest koštane srži, poremećaj metabolizma kalcija i minerala, malapsorpcija, hiper ili hipokalcijemija, aktivni hiper ili hipoparatiroidizam, aktivna bubrežna, jetrena ili srčana slabost, kronični alkoholizam, bolest ovisnosti ili oslabljena mentalna funkcija, hiperkalcijurija s aktivnim bubrežnim kamencima, aktivna srčana bolest unatrag 6 mjeseci, kirurški zahvati koji zahtjevaju hospitalizaciju. Unatrag 2 godine ispitanice nisu smjele uzimati dulje od mjesec dana bisfosfonate, estrogene, kombinaciju estrogena, inhalacijski ili potkožni kalcitonin, raloxifen, paratiroidni hormon ili fluoride. Navedenim uvjetima bile su isključene sve poznate metaboličke bolesti i stanja koja su mogla utjecati na poremećaj pregradnje i pogoršanje mineralne gustoće kosti tj. izazvati sekundarnu osteoporozu. U istraživanje su uključene relativno zdrave žene bez većih zdravstvenih tegoba.

## Metode

Svaka sudionica ispitivanja upoznata je s ciljem i načinom izvođenja kliničkog istraživanja, objašnjeno je da se radi o rutinskim kliničkim testovima i kontrolama u bolesnika s hipotalamo-hipofiznim bolestima ili bolestima štitnjače. Ispitanice su postavljale i dobile odgovore na sva pitanja, shvatile su da se radi o rutinskim pretragama osim što pristaju na češće vađenje krvi. Kliničko istraživanje i informirani pristanci su odobreni od Etičkih povjerenstava Kliničkih bolnica. Osigurani su osnovni demografski podaci i anamneza, a liječnički pregled i dobiveni podaci upisani su u povijest bolesti. Ispitivanje je uključivalo mjerenje TT i TV, BMD-a na DXA aparatu (Hologic Delphia) u svrhu određivanja osteoporoze, analizu krvi, hormona štitnjače i TSH u svrhu isključenja drugih bolesti štitnjače te otkrivanja drugih metaboličkih bolesti koje bi mogle utjecati na mineralni metabolizam kosti, uzrokovati osteoporozu i poremećaj pregradnje kosti.

Analiza rezultata je provedena korištenjem tehnika ELISA, EIA (enzymoimmuno assay) i RIA (radioimmuno assay) biokemijskih analiza, što podrazumijeva kvantitativno određivanje serumskog biljega koštane pregradnje tj. specifičnu koštanu alkalnu fosfatazu (BAP) (Ostase BAPEIA, Immunodiagnostic Systems Inc., SAD), 1-25 dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> (1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Gamma-B 1,25-Dihydroxy Vitamin D RIA, Immunodiagnostic Systems Inc., SAD), intaktni parathormon (PTH) (Cobas, Roche Diagnostics, Switzerland). Slobodni i ukupni hormoni štitnjače (FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>), TSH, OC i CTX analizirani su potpuno automatiziranom imunokemijskom metodom s elektrokemiluminiscentnom detekcijom (ECLIA, ElectroChemiLuminiscence ImmunoAssay) na instrumentu Elecsys 2010, tvrtke Roche (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), uz komercijalnu vanjsku (DGKL - Deutsche Vereinte Gesellschaft für Chemie und Labormedizin e.V.) i unutarnju (Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara) kontrolu kvalitete, a kao kontrolni materijal upotrebljeni su Precicontrol Universale i Precicontrol Bone. Standardne laboratorijske metode uz komercijalnu vanjsku i unutarnju kontrolu kvalitete i to: kalcij (Ca) – o-krezolftaleinska metoda, fosfor (P) – metoda s molibdatom, alkalna fosfataza (AP) – preporučena IFCC metoda na 37°C, uz AMP pufer. Upotrijebljeni su originalni Olympus reagensi na instrumentu Olympus AU 2700 (Olympus Diagnostica, Tokyo, Japan). Svi skupni rezultati su se iskazivali kao prosjek prema standardnoj pogrešci ( $X \pm SEM$ ), a normalni rasponi vrijednosti prikazani su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. prikazuje ispitivane biokemijske parametre u protokolu C s kraticama, očekivanim vrijednostima i jedinicama

Naziv	Kratica	Očekivana vrijednost	Jedinice
<b>TSH</b>		0,27 - 4,2	mU/L
<b>T3</b>		1,3 - 3,1	nmol/L
<b>T4</b>		66 - 181	nmol/L
<b>FT3</b>		3,95 - 6,8	pmol/L
<b>FT4</b>		12 - 22	pmol/L
<b>osteokalcin</b>	<b>OC</b>	Ž postM 15 - 46 Ž preM 11 - 43	μg/L
<b>B cross laps</b>	<b>CTX</b>	Ž postM 0,23 - 1,01 Ž preM 0,14 - 0,57	μg/L
<b>alkalna fosfataza</b>	<b>AP</b>	64 - 153	U/L
<b>koštana alkalna fosfataza</b>	<b>BAP</b>	Ž postM 6,5-22,4 Ž preM 4,5-14,3,	μg/L
<b>parathormon</b>	<b>PTH</b>	15 - 65	pg/mL
<b>1-25 vit. D3</b>	<b>1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	48 - 150	pmol/L
<b>kalcij</b>	<b>Ca</b>	2,14 - 2,53	mmol/L
<b>fosfor</b>	<b>P</b>	0,79 - 1,42	mmol/L

Uzorci krvi su skupljani nakon 12 sati gladovanja, natašte, ujutro između 8 i 10 sati, odmah su centrifugirani tijekom 15 min. na 3.000 G, odvojeni su serumi u tri alikvota, zamrznuti i do analize pohranjeni na -80<sup>0</sup>C u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitivani uzorci su kodirani tako da su podaci o ispitanicima poznati samo glavnom istraživaču. Uzorci su korišteni isključivo u cilju istraživanja funkcije štitne žlijezde, te odnosa TSH i koštanog metabolizma.

## **Odobrenja**

Navedena istraživanja su odobrena od strane etičkih povjerenstava kliničkih bolnica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkog bolničkog centra Zagreba i Kliničkog bolničkog centra “Sestre Milosrdnice”, kao i od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svim ženama je objašnjen način istraživanja, koje su prednosti i nedostaci usporedno s klasičnom obradom, obrada je za njih bila besplatna, a svi dobiveni rezultati istraživanja i klinički podaci korišteni su u liječenju i kontroli osteoporoze. Svojim su potpisom potvrdili da u istraživanju sudjeluju dobrovoljno, a preslika izjave o pristanku nalazi se u prilogu doktorske disertacije. Po završetku ispitivanja sve bolesnice su dobile povijest bolesti s klinički relevantnim rezultatima, DXA nalazom gustoće kosti, savjetom za liječenje i preporuke za kontrolu. U istraživanju su poštovana etička i humana načela u odnosu prema bolesnicima na osnovama dobre kliničke prakse (GCP).

### **4.3.1. Praćenje sekvencijskih promjena TSH i biljega koštane pregradnje u bolesnica s odstranjenom štitnjačom (protokoli C1 i C2)**

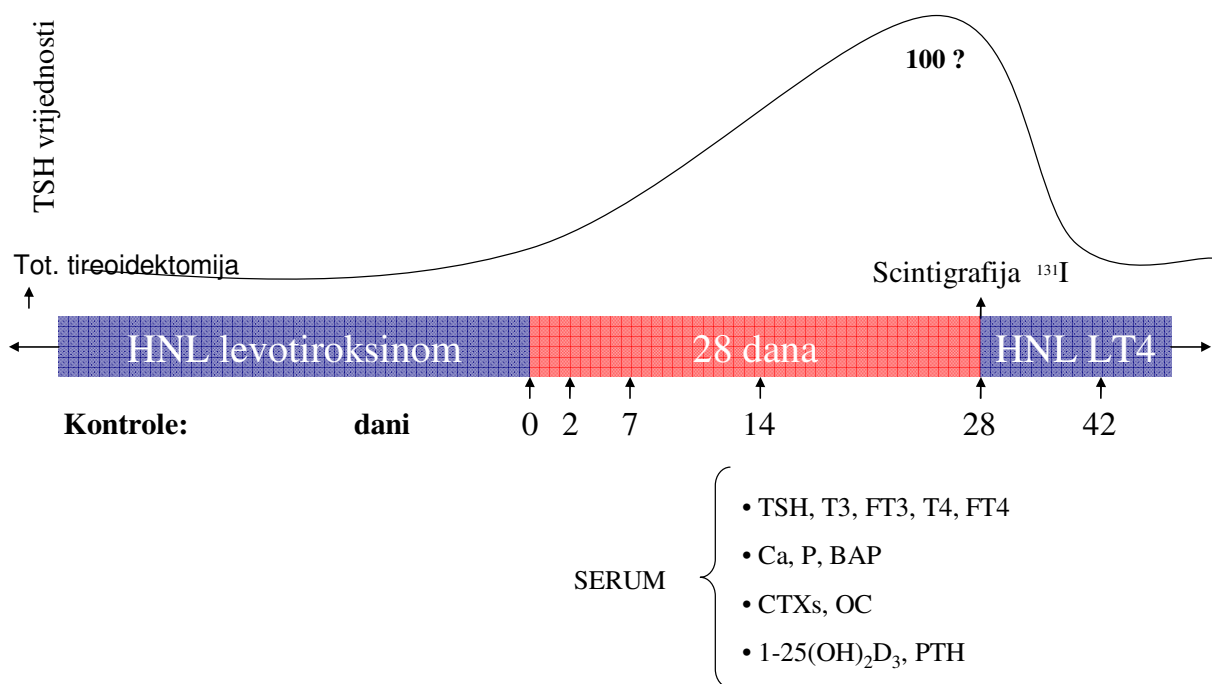
Skupinu od 6 ispitanica sačinjavaju žene kojima je ranije odstranjena štitna žlijezda zbog karcinoma (unatrag nekoliko mjeseci ili godina) i nalaze se u redovitim kontrolama. One trajno primaju tireosupresivnu terapiju LT4 kao hormonsko nadomjesno liječenje i prevenciju recidiva bolesti, a koja je prekinuta na razdoblje od 4 tjedna zbog kontrolne scintigrafije štitnjače pomoću J<sup>131</sup>. Nakon prekida HNL u ovih bolesnica dolazi do izrazitog povećanja vrijednosti endogenog TSH u serumu od nemjerljivo niskih do vrijednosti većih od 100 mU/L. Ovim protokolom (protokol C1) nastojali smo utvrditi utječe li trajni porast endogenog TSH na promjenu vrijednosti serumskih metaboličkih biljega koštane pregradnje, te na brzinu koštane pregradnje u razdoblju dovoljnom za izraziti porast serumskih TSH vrijednosti. Bolesnice se redovito kontroliraju u Zavodu za nuklearnu medicinu Kliničke bolnice «Sestre Milosrdnice» u Zagrebu.

U bolesnica na trajnoj tireosupresivnoj terapiji zbog operiranog karcinoma štitnjače prekida se HNL na 28 dana, a u vremenskim razdobljima od 0. do 42. dana određuju se serumski biljezi pregradnje kosti (CTXs, OC, BAP), slobodni (FT3 i FT4) i ukupni (T3 i T4) hormoni štitnjače, TSH, te vrijednosti PTH, 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Ca i P (slika 4.2.). Početak praćenja je od dana prekida uzimanja levotiroksina (0. dan), i slijedećih 6 tjedana, tj. 2., 7., 14. i 28. dan kada značajno raste serumska TSH vrijednost, a smanjuje se koncentracija hormona



štitnjače do nemjerljivo niskih vrijednosti. U dvije ispitanice su vrijednosti T3 i FT3 bile ispod granice detektibilnosti metode stoga je zbog matematičke obrade za vrijednost T3  $<0,291$  prihvaćena vrijednost T3 od 0,2 nmol/L, a za vrijednost FT3  $<0,392$  prihvaćena je vrijednost FT3 od 0,3 pmol/L. Zadnji dan prekida terapije učinjena je kontrolna scintigrafija štitnjače s obilježenim  $J^{131}$  (28. dan) što je povezano s osnovnom bolešću, nakon čega je ponovno uvedena tireosupresivna terapija i nakon 14 dana tj. 42. dan od početka ispitivanja učini se zadnja kontrola biokemijskih parametara, kada smo očekivali smanjenje visokih vrijednosti endogenog TSH u serumu. Početne vrijednosti (0. dan) kada je TSH nemjerljivo nizak (suprimiran) uspoređivane su s ispitivanim vrijednostima metaboličkih parametara (2., 7., 14., 28. i 42. dan) kada je zbog prekida tireosupresivnog liječenja serumski TSH bio u fazi naglog porasta do maksimalnih vrijednosti.

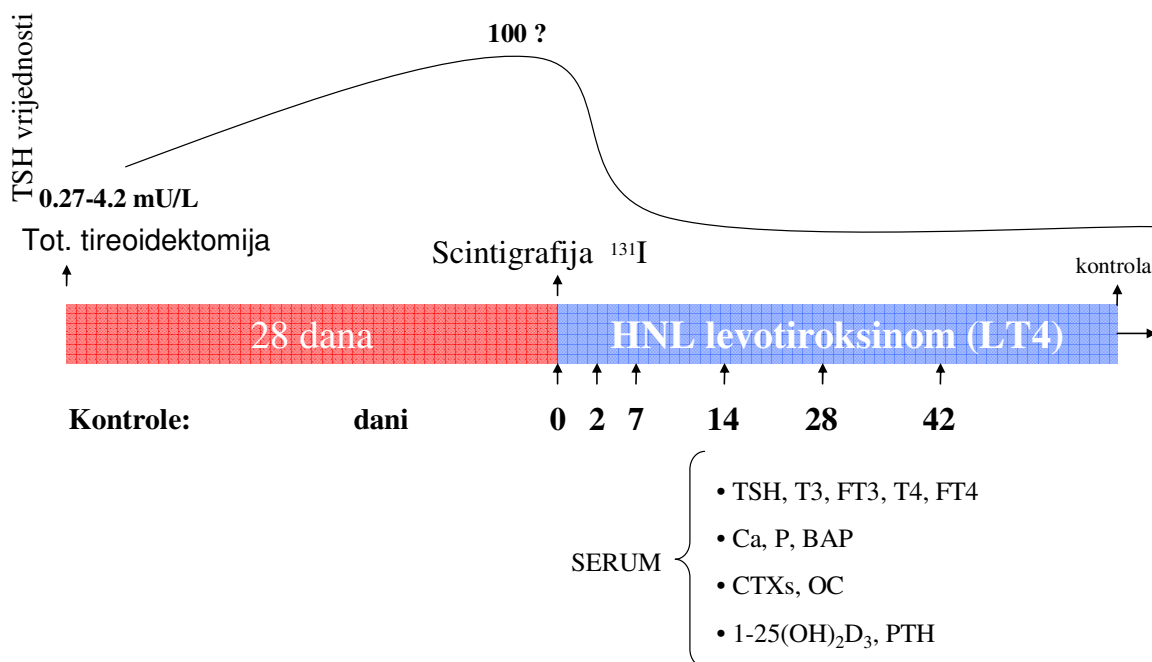
Slika 4.2. Protokol kliničkog ispitivanja utjecaja niskog endogenog TSH na biljege koštane pregradnje, hormone štitnjače i druge metaboličke parametre nakon prekida tireosupresivnog liječenja levotiroksinom u žena s totalnom tireoidektomijom zbog karcinoma štitnjače (protokol C1).



Drugu skupinu od 5 žena kojima je potpuno odstranjena štitnjača (totalna tireoidectomy) zbog karcinoma i koje su tijekom 28 postoperativnih dana bile bez vlastitih hormona štitnjače i hormonskog nadomjesnog liječenja, u svrhu rutinskog pregleda skeleta na moguće metastaze karcinoma štitnjače tj. scintigrafije štitnjače pomoću  $J^{131}$ , došlo je do izrazitog porasta serumskih TSH vrijednosti (TSH >60 mU/L). Potom je uvedena tireosupresivna terapija levotiroksinom tijekom koje u slijedećih mjesec dana dolazi do smanjenja TSH na vrijednosti ispod granica normale (TSH <0,27 mU/L). Ovim protokolom (protokol C2) utvrđeno je kako postupno sniženje visokih serumskih vrijednosti endogenog TSH utječe na promjene vrijednosti koštanih serumskih biljega za stvaranje i razgradnju kosti, te na brzinu koštane pregradnje u razdoblju dovoljnom za promjenu od vrlo visokih serumskih TSH vrijednosti do normalne razine ili niže (supresija TSH). Bolesnice se redovito kontroliraju u Zavoda za nuklearnu medicinu Kliničke bolnice «Sestre Milosrdnice» u Zagrebu.

Nakon 28 dana od totalne tireoidectomy i bez hormonske zamjene, počinje se sa primjenom supstitucije levotiroksina i u vremenskim razdobljima od 0. do 42. dana određuju se serumski biljezi pregradnje kosti (CTXs, OC, BAP), slobodni (FT3 i FT4) i ukupni (T3 i T4) hormoni štitnjače, TSH, te vrijednosti PTH, 1-25(OH) $_2$ D $_3$ , Ca i P (slika 4.3.). Početak praćenja je 28 dana nakon operativnog zahvata (0. dan), i slijedećih 6 tjedana, tj. 2., 7., 14. i 28. dan do normalizacije vrijednosti TSH, a potom nakon 14 dana tj. 42. dan tireosupresivnog hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL) levotiroksinom kada se očekuje TSH ispod donje granice normalnih vrijednosti. U tri ispitanice su vrijednosti T3 i FT3 bile ispod granice detektibilnosti metode stoga je zbog matematičke obrade za vrijednost T3 <0,291 prihvaćena vrijednost T3 od 0,2 nmol/L, a za vrijednost FT3 <0,392 prihvaćena je vrijednost FT3 od 0,3 pmol/L. Početne vrijednosti (0. dan), kada je TSH bio vrlo visok, uspoređivane su s ispitivanim vrijednostima (2., 7., 14., 28. i 42. dan) kada je serumski TSH bio u fazi smanjenja zbog primjene tireosupresivne terapije LT4 do nemjerljivo niskih vrijednosti.

Slika 4.3. Protokol kliničkog ispitivanja utjecaja visokog endogenog TSH na biljege koštane pregradnje, hormone štitnjače i druge metaboličke parametre u žena nakon 28 dana od totalne tireoidektomije i uvođenja tireosupresivne terapije levotiroksinom (protokol C2).



#### 4.3.2. Učinak jednokratne stimulacije endogenog TSH pomoću tireotropnog hormona (TRH) na biljege koštane pregradnje u bolesnica s postmenopauzalnom osteoporozom

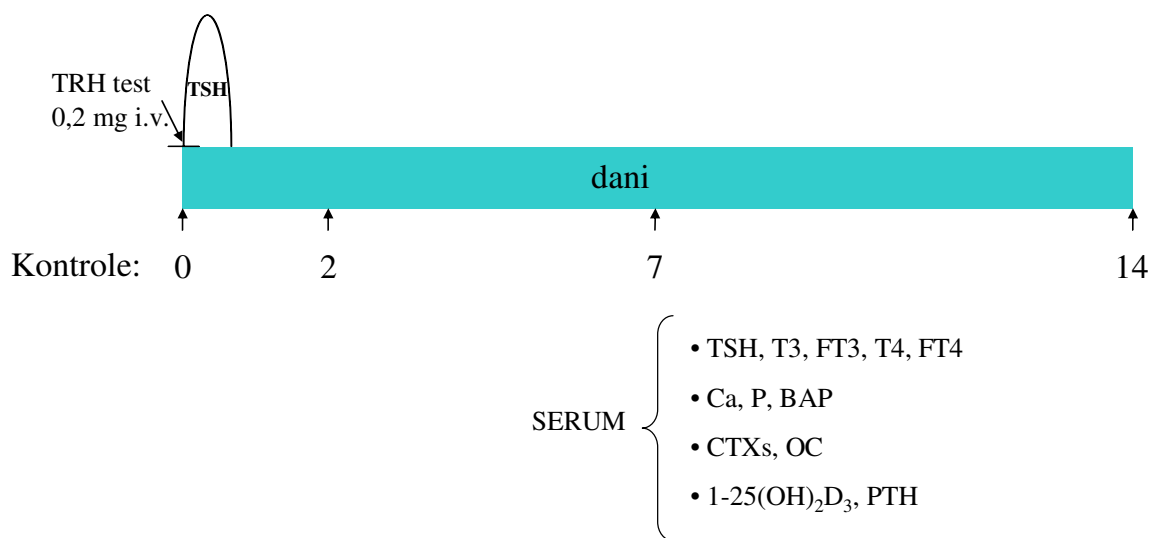
Tireotropin oslobađajući hormon (TRH) se nalazi u hipotalamusu mozga i stimulira stvaranje i lučenje tireotropnog hormona prednjeg režnja hipofize (TSH). Osnovni mehanizam kontrole lučenja TSH se sastoji u ravnoteži pozitivnog učinka TRH (pozitivna kontrola) i jakog negativnog učinka prekomjernog lučenja hormona štitnjače (negativna povratna sprega). Bazalne vrijednosti TSH se očekuju normalne, a nakon stimulacije pomoću 0,2 mg TRH i.v. u ljudi dolazi do jednokratnog, brzog i prolaznog porasta TSH. Maksimalni porast TSH u 20 min. testa iznosi 5-10 puta prema bazalnoj vrijednosti, a vraćanje prema normali

nalazi se već nakon 60 minuta (19). Prije uključivanja u ispitivanje, prema anamnestičkim podacima, dostupnoj medicinskoj dokumentaciji i učinjenim pretragama, pacijentice s postmenopauzalnom osteoporozom morale su zadovoljiti navedene uključujuće i isključujuće kriterije, znači biti relativno zdrave žene bez akutnih ili kroničnih bolesti koje bi mogle utjecati na pregradnju kosti, osim nesekretornog (kromofobnog) tumora hipofize koji također ne utječe na koštane metaboličke promjene ili pregradnju kosti. Nakon razgovora s pacijenticama i uvidom u medicinsku dokumentaciju, potpisa informiranog pristanka, izmjerena je mineralna gustoća kosti DXA metodom na aparatu Hologic (Delphia) u svrhu potvrde osteoporoze prema kriterijima SZO-a. Ispitanice uključene u istraživanje su eutireotične žene s postmenopauzalnom osteoporozom u kojih se očekuje pojačana pregradnja kosti zbog osnovne bolesti, stoga i bolji učinak na supresiju pregradnje.

U ovoj skupini od 33 žene s postmenopauzalnom osteoporozom ispitivan je prema protokolu (protokol C3) utjecaj jednokratnog porasta endogenog TSH nakon TRH testa (0,2 mg TRH, Ferring) na biljege pregradnje kosti (CTXs, OC, BAP), slobodne (FT3 i FT4) i ukupne (T3 i T4) hormone štitnjače, TSH, te vrijednosti PTH, 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Ca i P (slika 4.4.). Uzorci krvi za biokemijske i hormonalne pretrage su skupljani prema stručnim preporukama, naime pacijentice su ispitivanju pristupile ujutro natašte, između 8 i 10 sati tj. nakon 12 sati gladovanja. Nakon pola sata mirovanja u ležećem položaju, nastavljeno je testiranje primjenom jednokratne doze od 0,2 mg TRH i.v. Obzirom da u TRH testu do oslobađanja TSH iz štitne žlijezde dolazi u relativno kratkom vremenskom razdoblju, vrijednosti TSH u serumu su određene u kontroli prije primjene TRH (-30 i 0 min), te nakon 20 i 60 minuta od injiciranja 0,2 mg TRH i.v., da bi se odredila veličina porasta TSH tijekom jednokratne endogene stimulacije.

Neposredno prije TRH testa (0. dan) i tijekom slijedeća dva tjedna (2., 7. i 14. dan) prati se utjecaj jednokratne endogene stimulacije TSH na različite oblike perifernih hormona štitnjače, TSH, serumske biljege koštane pregradnje, kalcij, fosfat, vitamin D3 i PTH. Odgovoriti ćemo na pitanje je li jednokratna stimulacija izlučivanja endogenog TSH iz štitne žlijezde, za razliku od protokola C1 i C2 u kojih je porast odnosno pad vrijednosti endogenog TSH u serumu značajno veći i postupan, utječe na promjenu biljega koštane pregradnje, odnosno da li dolazi do promjene drugih parametara koji mogu utjecati na metabolizam kosti (npr. hormoni štitnjače, kalcij, fosfat, PTH i vitamin D).

Slika 4.4. Protokol kliničkog ispitivanja utjecaja jednokratne endogene stimulacije TSH primjenom 0,2 mg TRH na biokemijske biljege koštane pregradnje, hormone štitnjače i druge metaboličke parametre u postmenopauzalnih žena s osteoporozom.



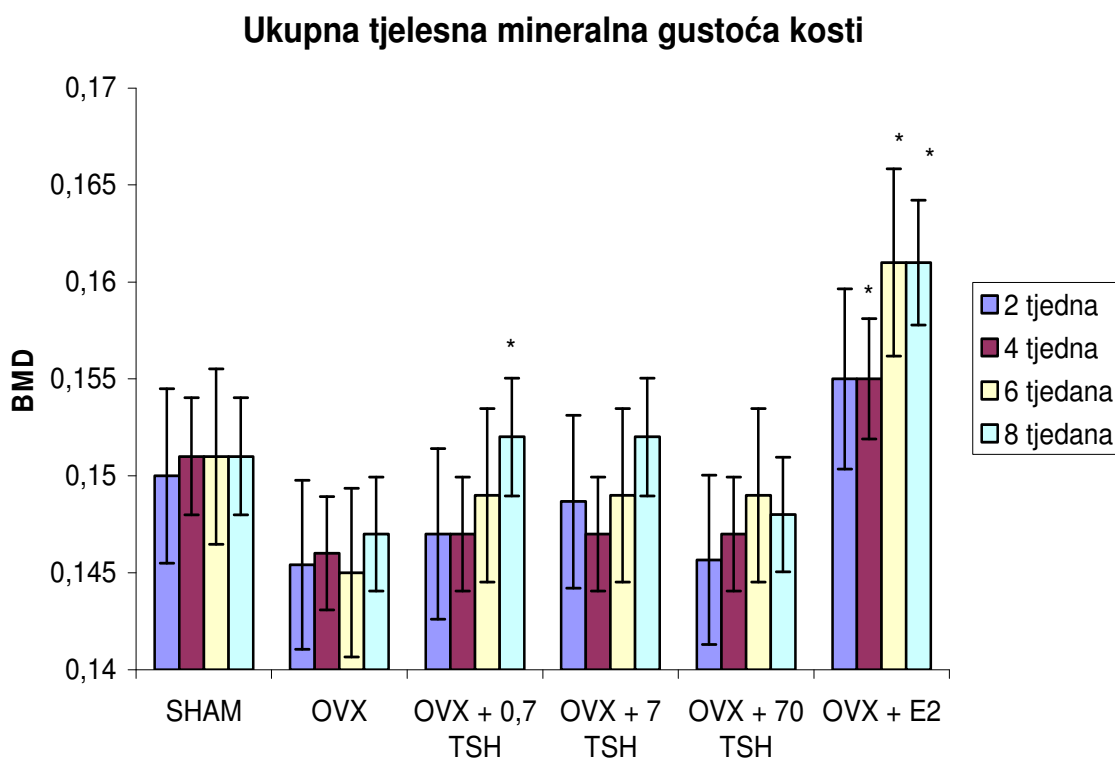
## 5. REZULTATI

### 5.1. Učinak cikličke primjene humanog TSH u sprječavanju gubitka kosti u pokusima na životinjama

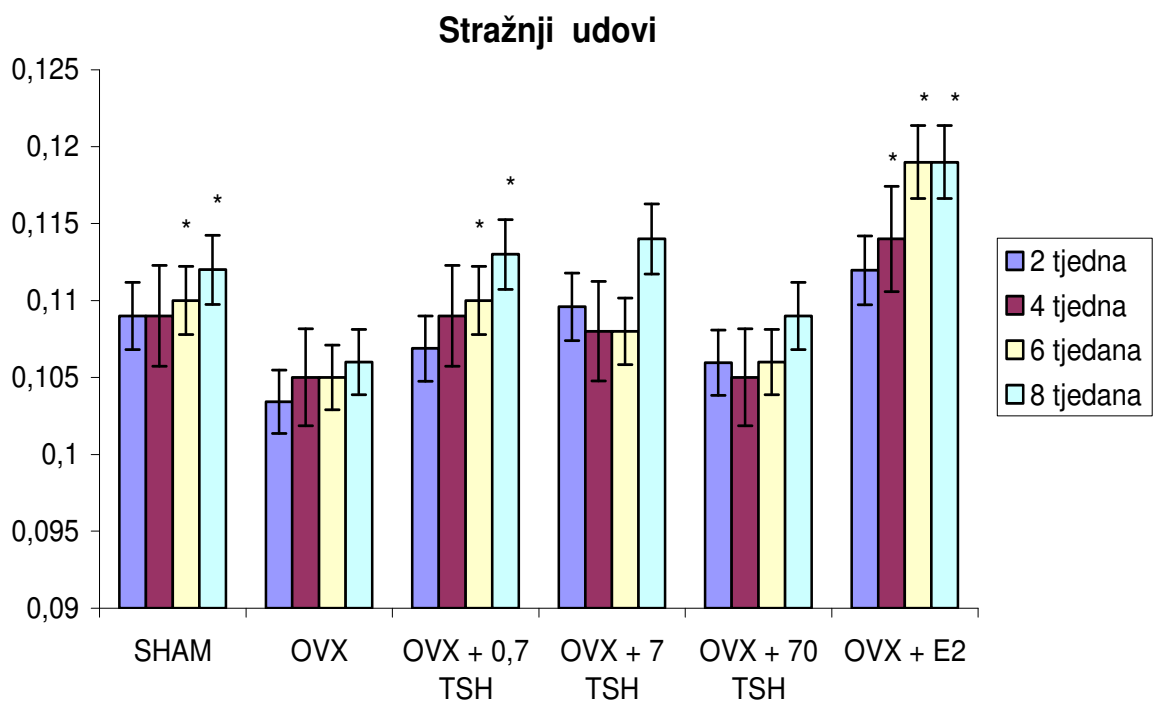
#### *In vivo* DXA rezultati

Životinje koje su dobivale 0.7  $\mu$ g humanog TSH imale su značajno povišene vrijednosti BMD stražnjih udova u odnosu na OVX životinje nakon 6 tjedana terapije. Nakon 8 tjedana životinje koje su dobivale 0.7  $\mu$ g humanog TSH su imale značajno povećan BMD u cijelom tijelu, stražnjim udovima i slabinskoj kralježnici (Slike 5.1.1; 5.1.2. i 5.1.3.).

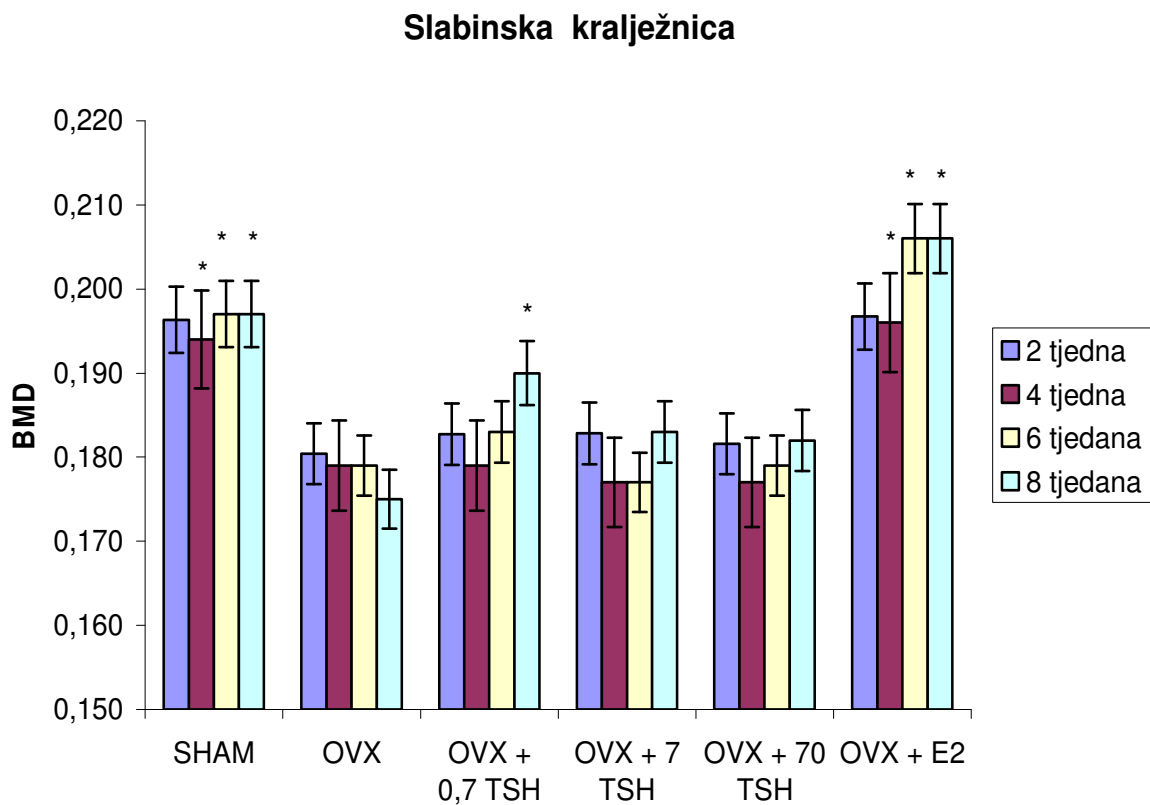
Slika 5.1.1. *In vivo* ukupna tjelesna mineralna gustoća.



Slika 5.1.2. *In vivo* mineralna gustoća kosti stražnjih udova.



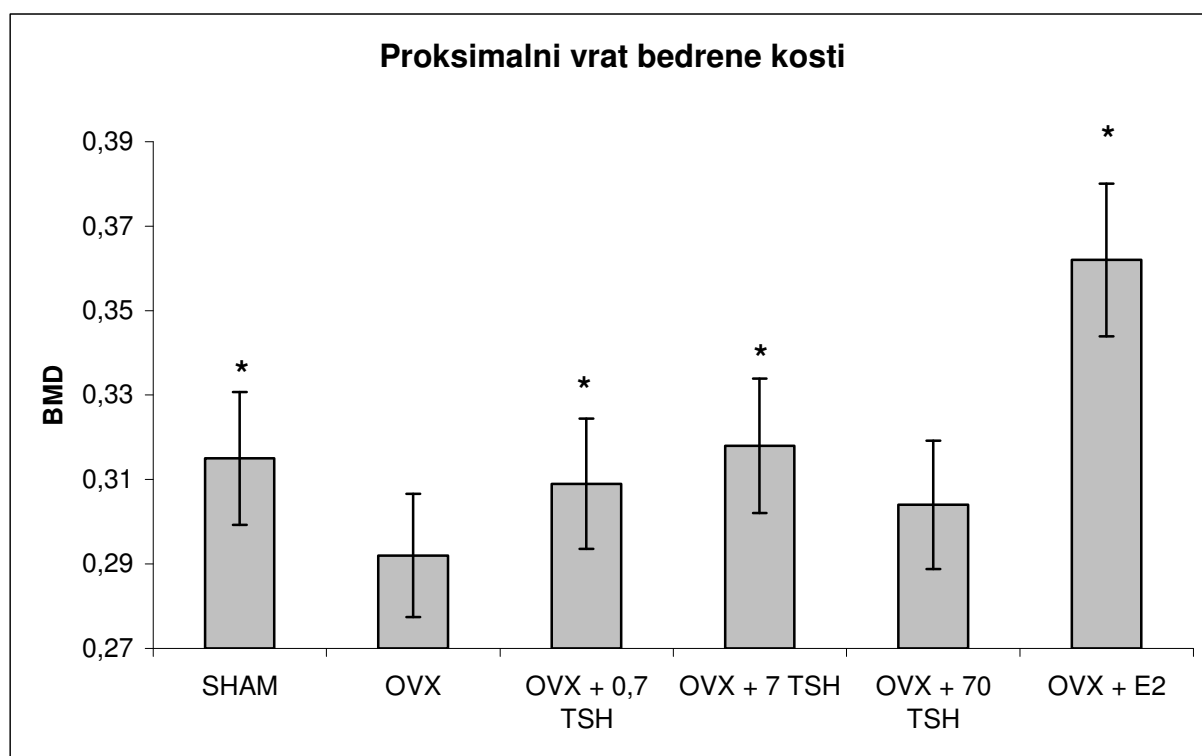
Slika 5.1.3. *In vivo* mineralna gustoća kosti slabinske kralježnice.



### ***Ex vivo* DXA rezultati**

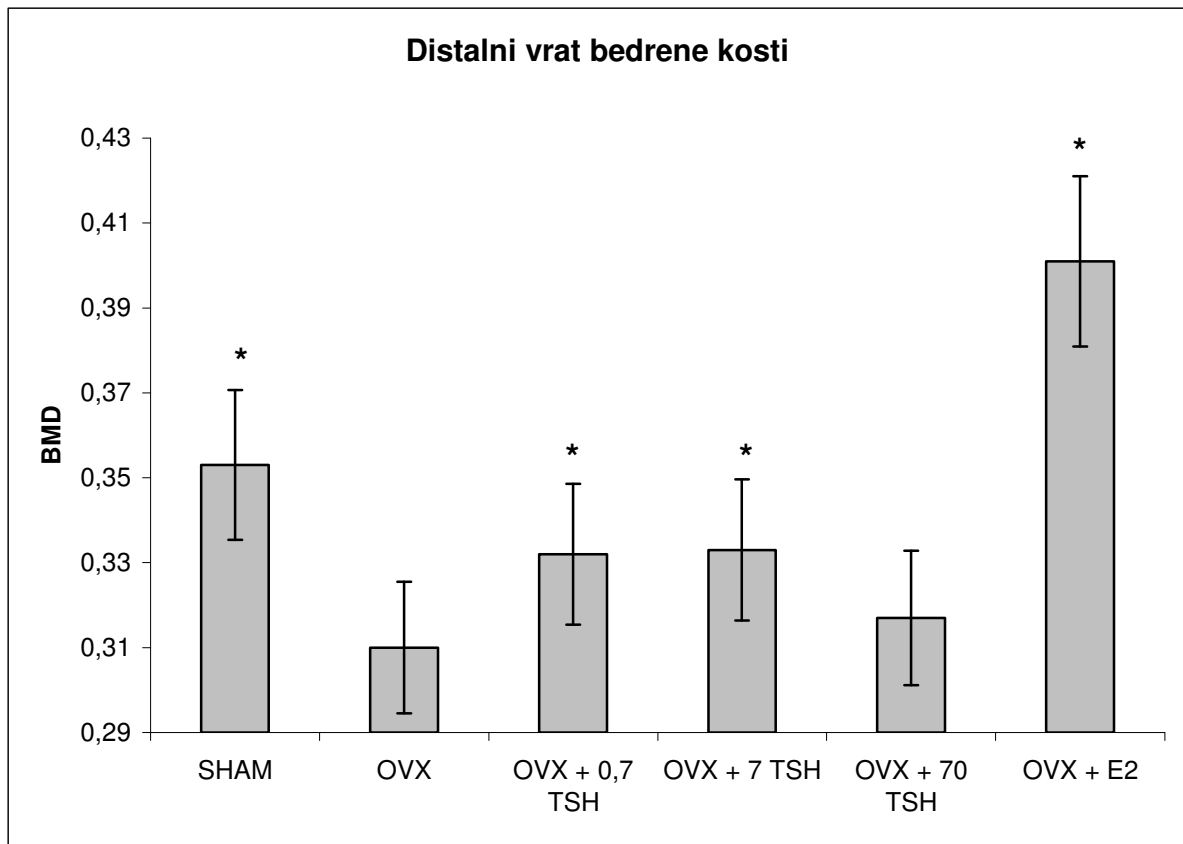
*Ex vivo* DXA mjerenja kosti su pokazala statistički značajno povećanje BMD u proksimalnom i distalnom vratu bedrene kosti životinja koje su dobivale 0.7 i 7  $\mu\text{g}$  humanog TSH u odnosu na OVX štakore. BMD tibije i slabinske kralježnice se nije statistički značajno razlikovao kod skupina koje su dobivale TSH i OVX štakora (Slike 5.1.4.; 5.1.5.; 5.1.6. i 5.1.7.).

Slika 5.1.4. *Ex vivo* mineralna gustoća kosti proksimalnog vrata bedrene kosti.

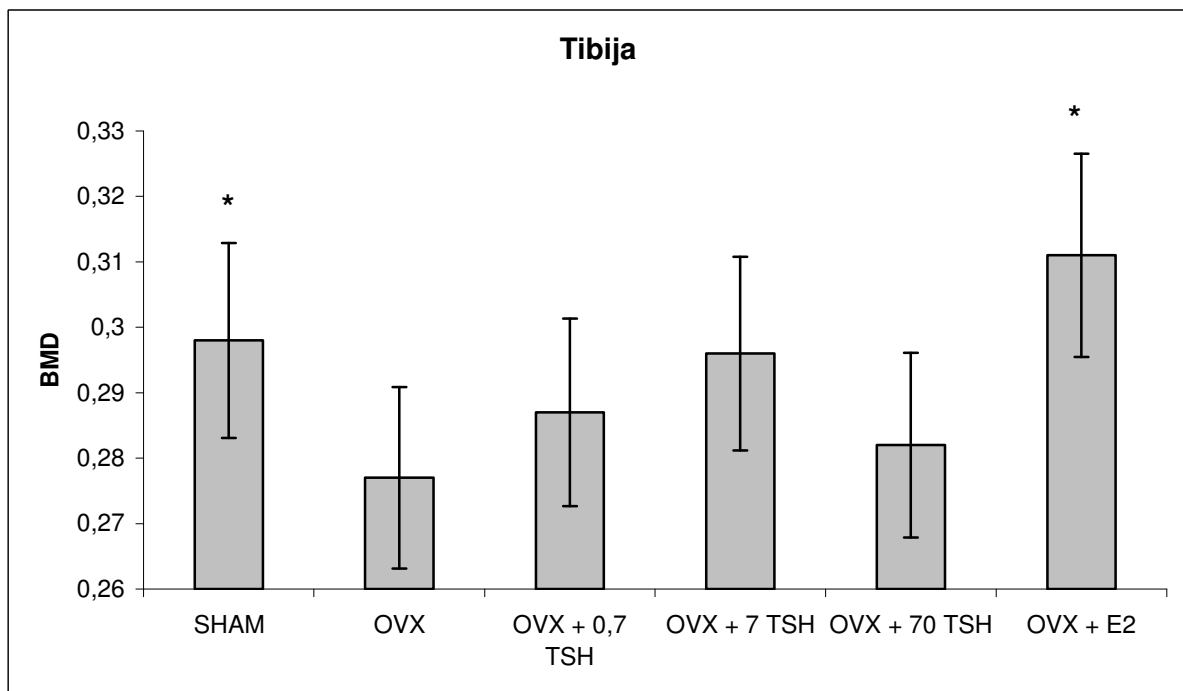




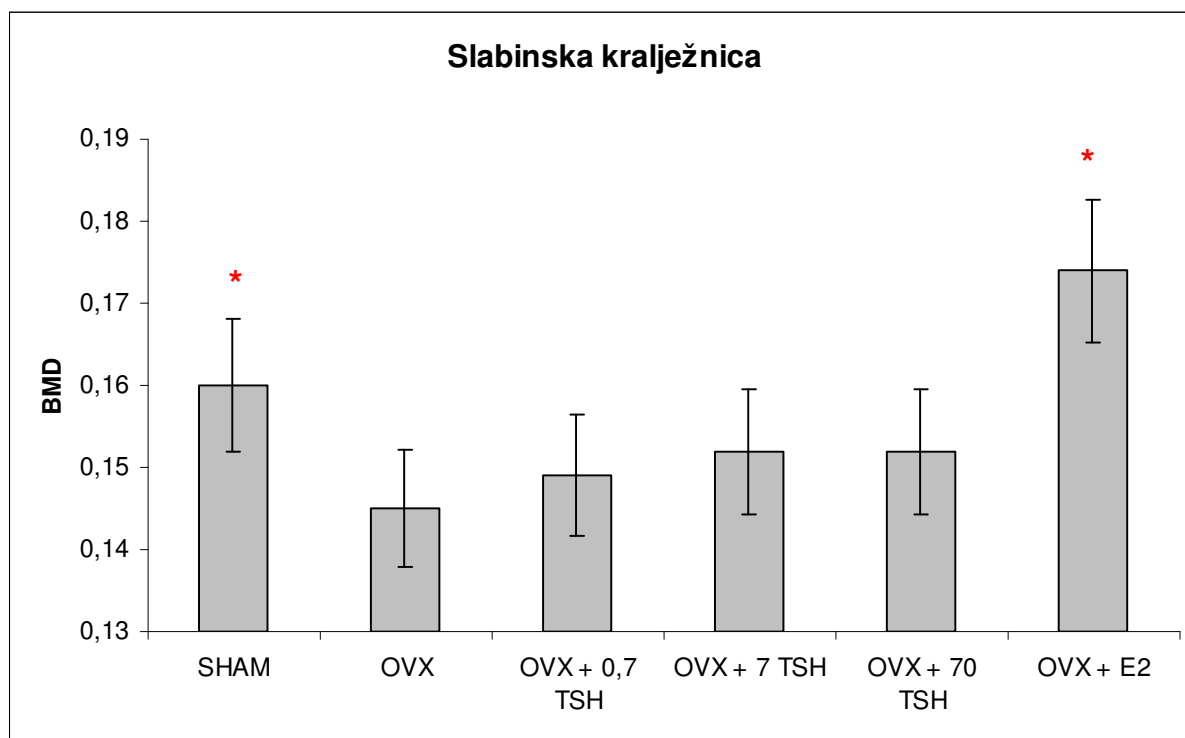
Slika 5.1.5. *Ex vivo* mineralna gustoća kosti distalnog vrata bedrene kosti.



Slika 5.1.6. *Ex vivo* mineralna gustoća kosti tibije.



Slika 5.1.7. *Ex vivo* mineralna gustoća kosti slabinske kralježnice.



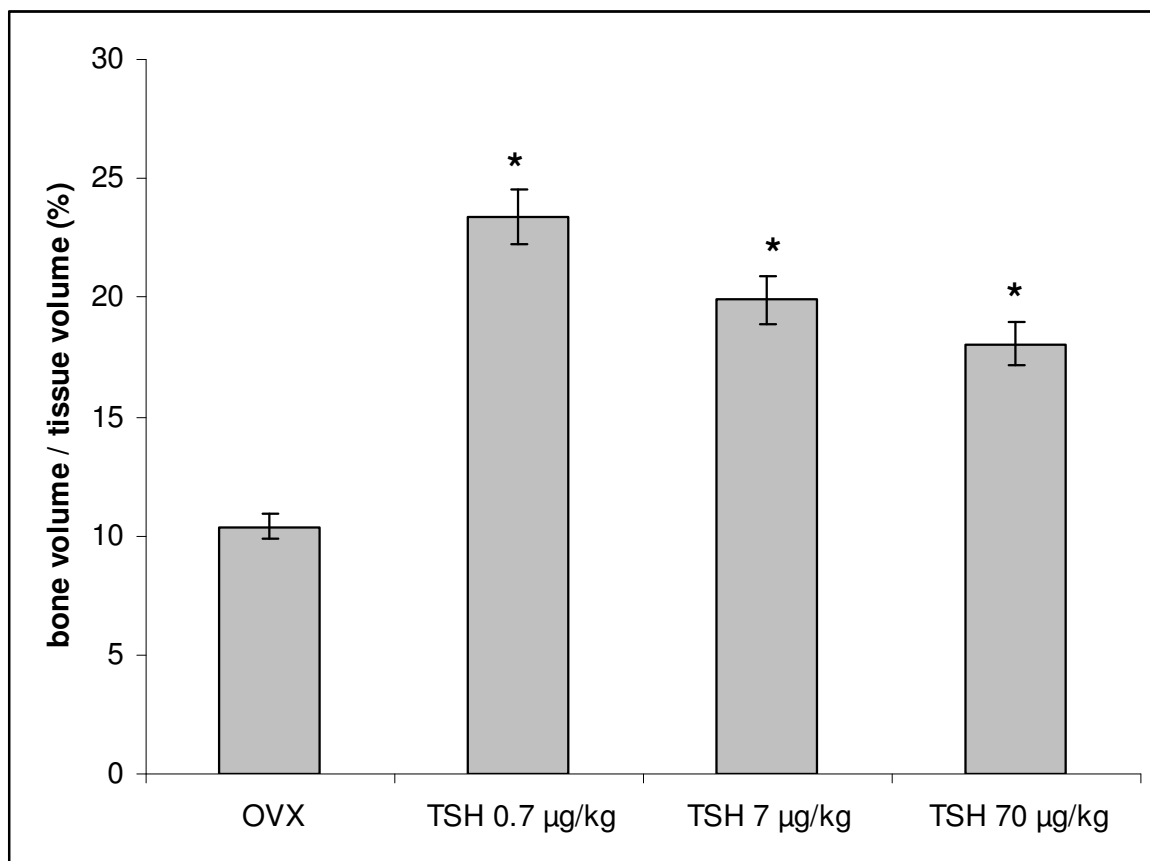
Histološka obrada vrata bedrene kosti pokazala je da su ovarijektomirane životinje na kraju pokusa imale značajan gubitak kosti u odnosu na lažno operirane, kontrolne štakore, dok je primjena TSH značajno spriječila gubitak koštane mase. Najučinkovitija bila je najmanja doza humanog TSH od 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tablica 5.1.1.). Analizom statičkih parametara vidljivo je da je volumen kosti značajno veći u svih štakora u odnosu na OVX životinje, a to se odnosi i na površinu kosti/volumen tkiva, broj trabekula, debljinu trabekula, kao i razmak između pojedinih trabekula koji je značajno manji u svih životinja koje su primale TSH u razdoblju od 8 tjedana (Tablica 5.1.1.; Slike 5.1.8.; 5.1.9.; 5.1.10.; 5.1.11. i 5.1.12.).

Tablica 5.1.1. Statički koštani parametri distalnog vrata bedrene kosti kod OVX štakora tretiranih humanim TSH. Analizirani parametri uključuju volumen kosti/volumen tkiva (BV/TV), površina kosti/volumen tkiva (BS/TV), broj trabekula (Tb.Nm.), debljinu trabekula (Tb.Th.) i razmak između trabekula (Tb.Sp.). Podaci su izraženi kao  $X \pm \text{SD}$ . (\* značajno različito od OVX životinja (\*  $P < 0.05$ ), ANOVA-Dunnett test).

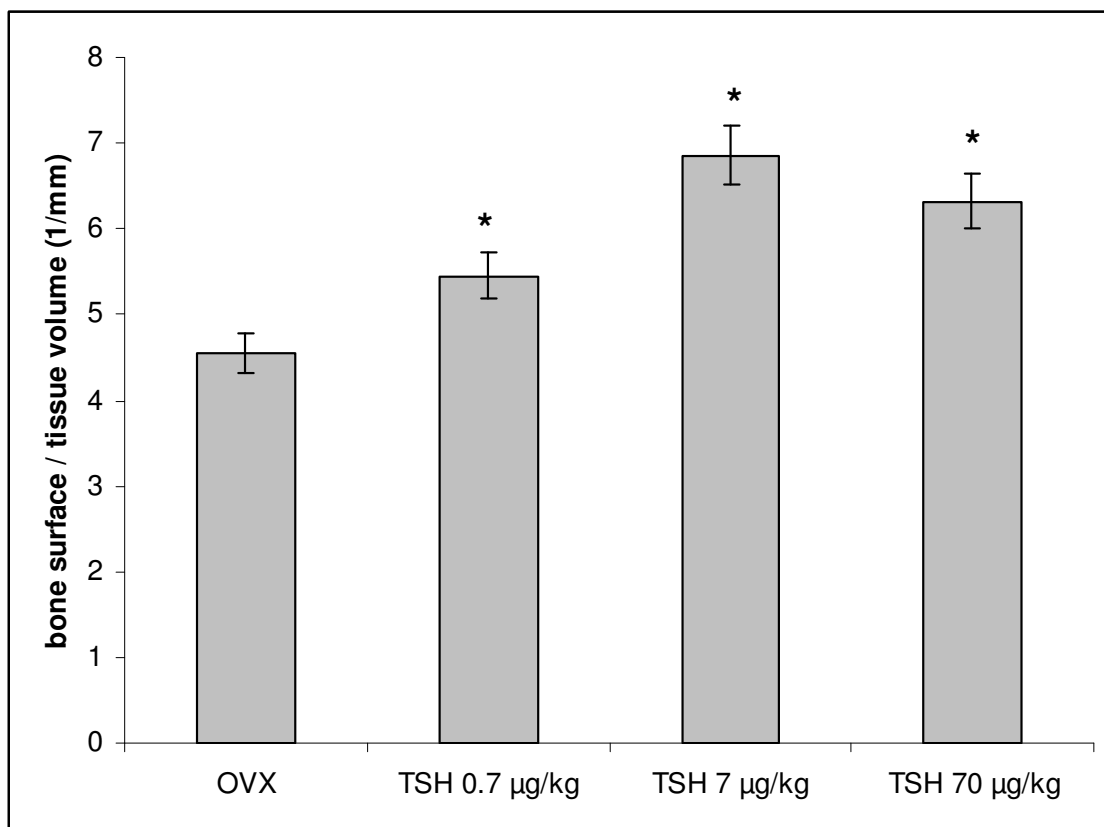
### Statički koštani parametri

Pokusne skupine	BV/TV (%)	BS/TV (1/mm)	Tb. Nm. (1/mm)	Tb. Th. (mm)	Tb. Sp. (mm)
Sham++ (n=6)	31.23±11.21*	8.75±2.54*	4.46±1.20*	0.070±0.07*	0.10±0.11*
OVX (n=6)	10.39±3.41	4.55±1.20	2.18±0.65	0.047±0.01	0.461±0.18
TSH 0.7 µg/kg (n=6)	23.41±7.38*	5.45±1.06*	3.22±0.68*	0.074±0.02*	0.263±0.08*
TSH 7 µg/kg (n=6)	19.89±3.35*	6.86±0.60*	3.44±0.28*	0.057±0.01*	0.236±0.03*
TSH 70 µg/kg (n=6)	18.03±3.83*	6.32±0.99*	3.16±0.50*	0.060±0.01*	0.270±0.05*

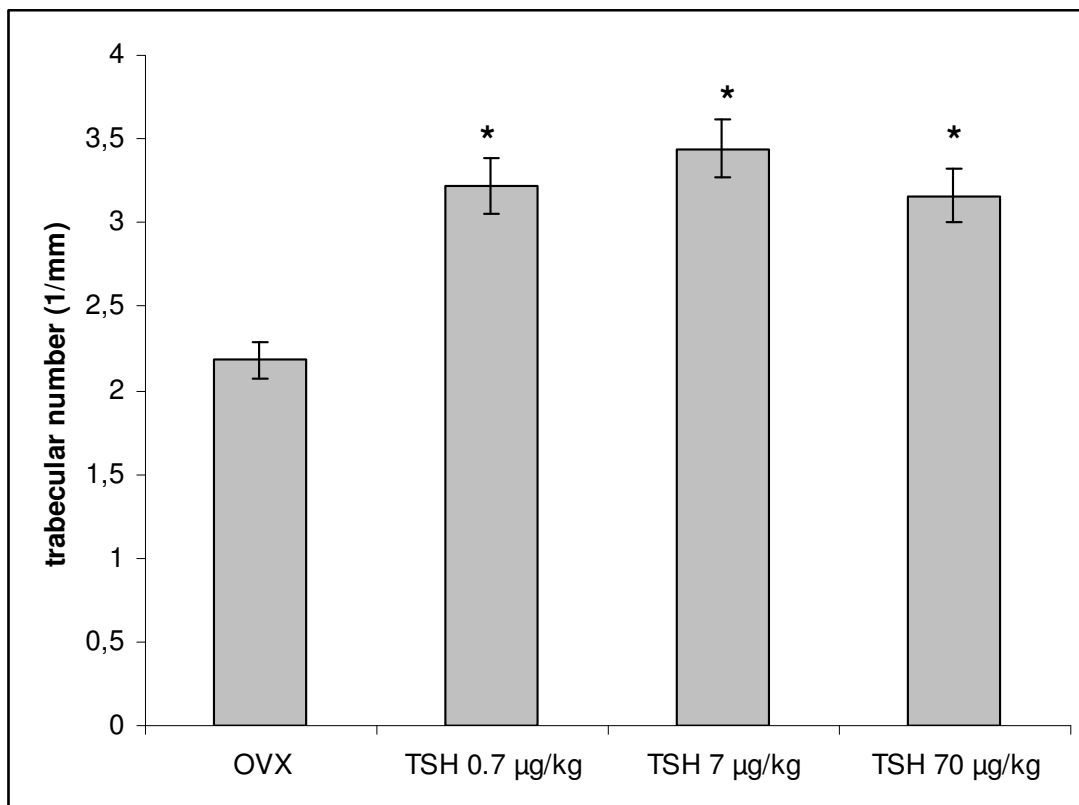
Slike 5.1.8. Statički koštani parametri (Volumen kosti/volumen tkiva - %)



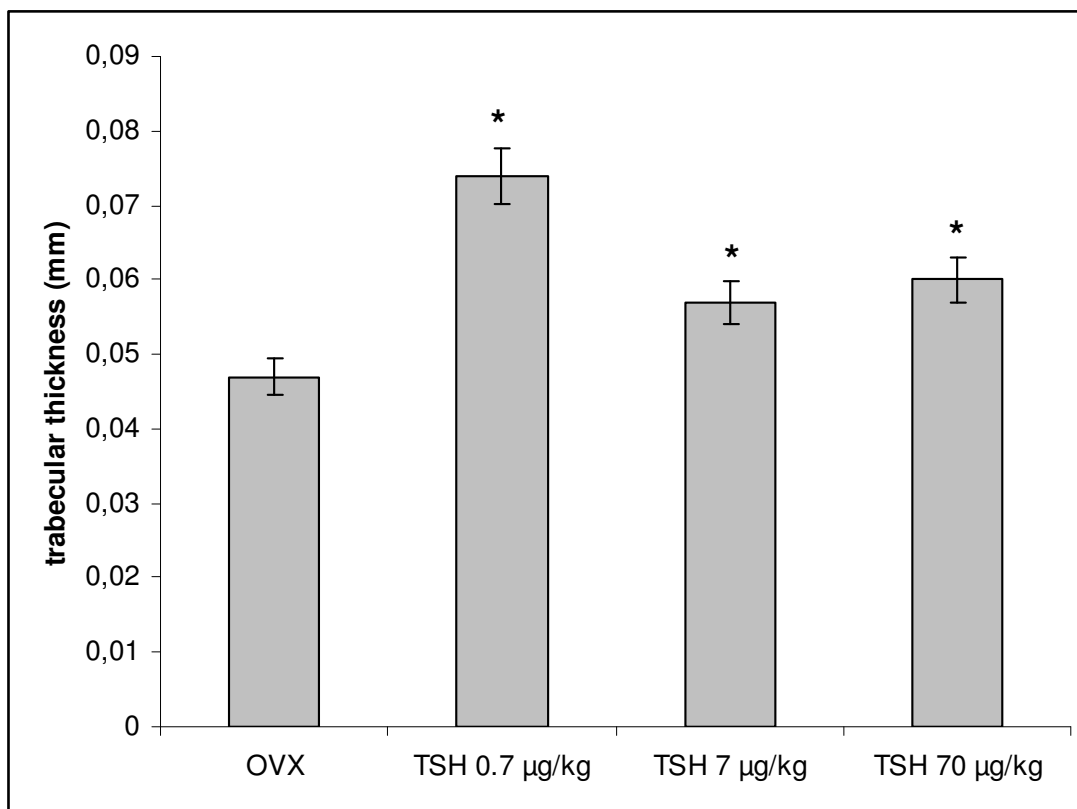
Slike 5.1.9. Statički koštani parametri (Površina kosti/volumen tkiva - 1/mm)



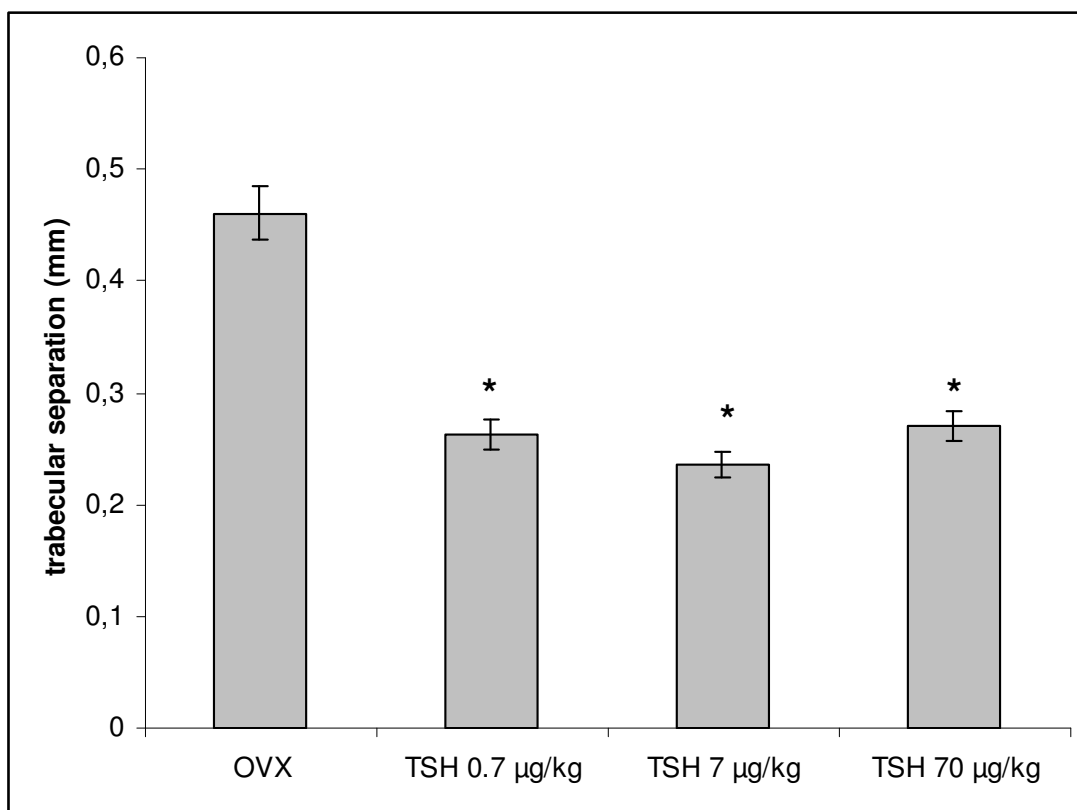
Slike 5.1.10. Statički koštani parametri (Broj trabekula - 1/mm)



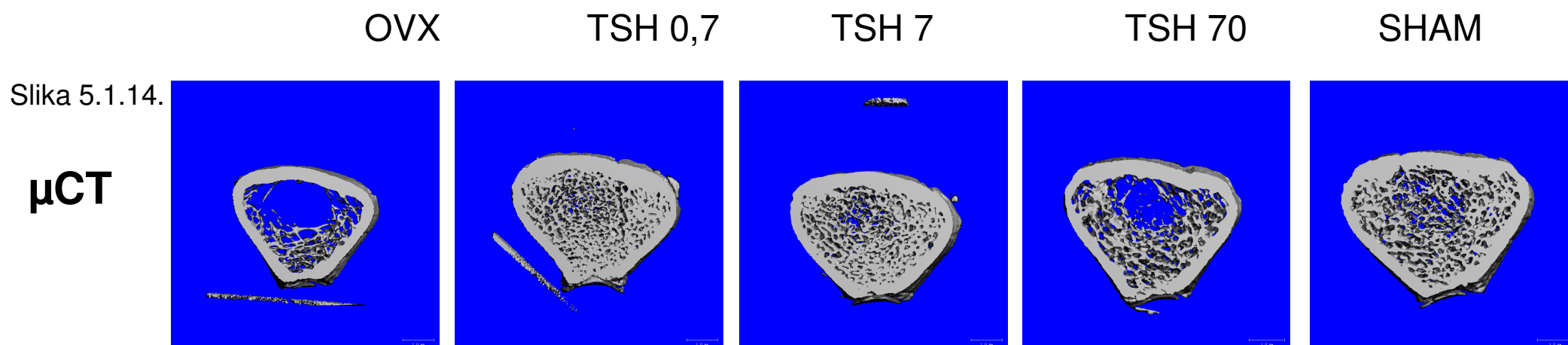
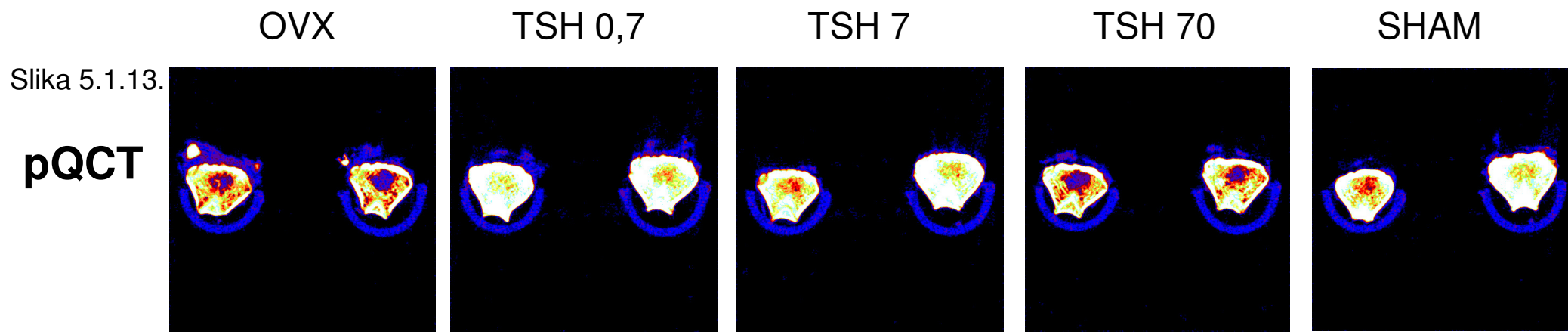
Slike 5.1.11. Statički koštani parametri (Debljina trabekula - mm)



Slike 5.1.12. Statički koštani parametri (Razmak između trabekula - mm)



Taj je nalaz potvrđen pQCT analizom kortikalne i trabekularne kosti (Slika 5.1.13.), iz koje je vidljivo da niže doze TSH imaju veći učinak na volumen kosti u odnosu na najveću dozu TSH. Iz  $\mu$ CT analize distalnog kraja femura jasno je uočljivo da doza od 0.7 i 7  $\mu$ g/kg TSH značajno povećava broj trabekula za razliku od najveće doze TSH koja je pokazala manju učinkovitost (Slika 5.1.14.).



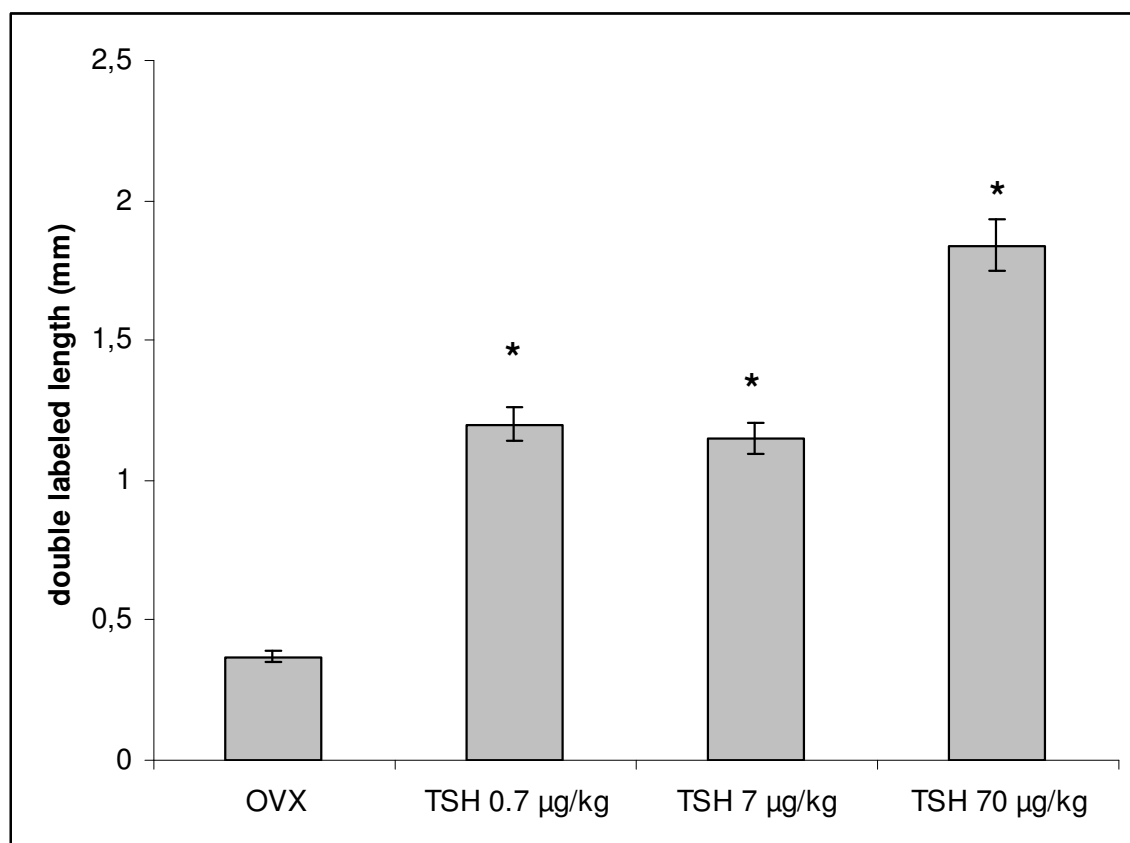
Tablica 5.1.2. Dinamički koštani parametri distalnog vrata bedrene kosti kod OVX štakora tretiranih humanim TSH. Analizirani parametri uključuju duljinu dvostruko obilježenih površina (dL. Le.), debljinu između obilježenih površina (IrL. Th.), širinu između obilježenih površina (IrL. Wi.), mineraliziranu površinu kao postotak površine kosti (MS/BS), brzinu odlaganja minerala (MAR), brzinu stvaranja kosti/ referentna površina kosti (BFR/BS) i brzinu stvaranja kosti/ referentni volumen kosti (BFR/BV). Podaci su izraženi kao X±SD. (\* značajno različito od OVX životinja (\* P<0.05), ANOVA-Dunnett test).

**Dinamički koštani parametri**

Pokusne skupine	dL. Le (mm)	IrL. Th. (µm)	IrL. Wi. (µm)	MS/BS (%)	MAR (µm/dnevno)	BFR/BS (%/godišnje)	BFR/BV (%/godišnje)
Sham++ (n=6)	0.23±0.19*	4.88±1.15*	5.36±1.85*	13.21±2.74*	0.44±0.11*	18.78±5.88*	51.50±5.97*
OVX (n=6)	0.37±0.23	5.73±1.37	7.30±1.75	11.69±3.67	0.57±0.14	25.71±13.26	110.93±52.67
TSH 0.7 µg/kg (n=6)	1.2±0.53*	12.31±2.75*	15.68±3.51*	24.88±5.39*	1.23±0.28*	115.47±49.83*	561.98±179.4*
TSH 7 µg/kg (n=6)	1.15±0.62*	13.71±3.32*	17.45±4.22*	24.49±9.09*	1.37±0.33*	131.20±72.48*	548.79±290.9*
TSH 70 µg/kg (n=6)	1.84±0.57*	12.72±2.71*	16.19±3.44*	31.73±8.51*	1.27±0.27*	153.64±73.82*	667.70±261.6*

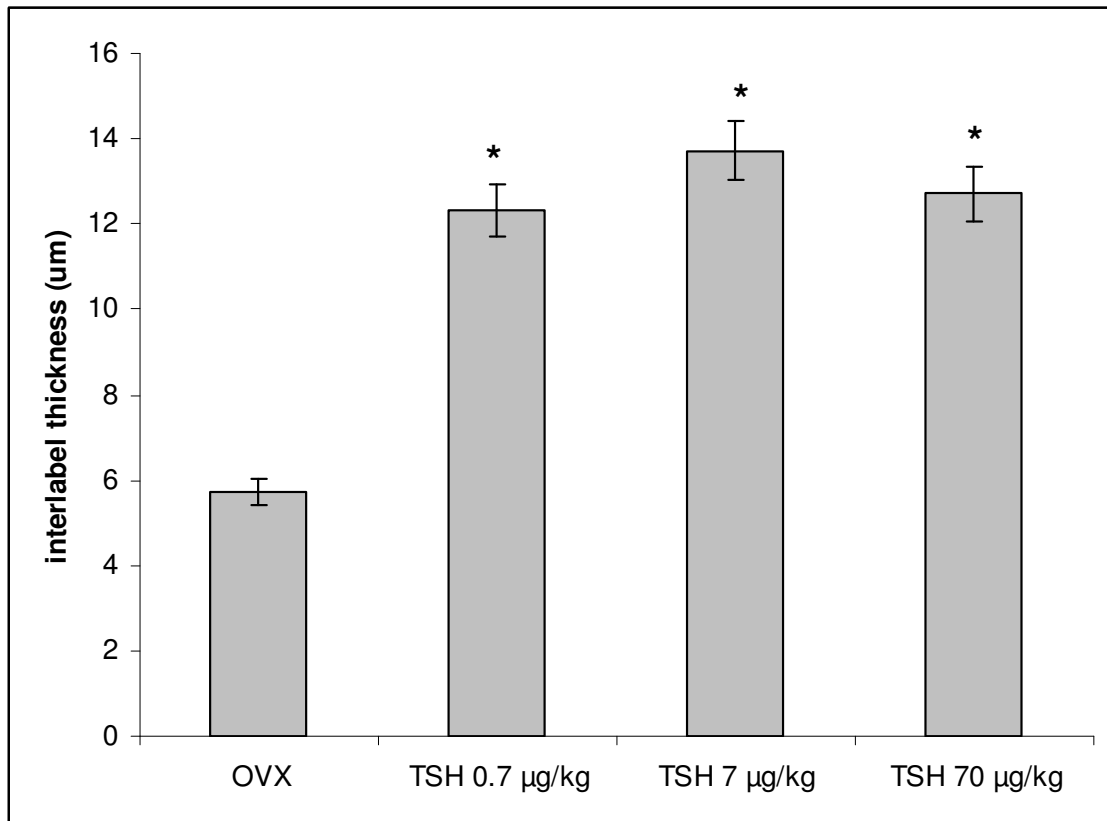
Analizom dinamičkih koštanih parametara vrata bedrene kosti štakora (Tablica 5.1.2.) utvrdili smo da TSH značajno povećava duljinu tetraciklinom dvostruko obilježenih površina, s time da je najučinkovitija doza od 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Debljina između obilježenih površina tetraciklinom, te širina između obilježenih površina, mineralizirana površina u odnosu na ukupnu površinu kosti, kao i brzina odlaganja minerala, te brzina stvaranja kosti znatno su bile povećane u svih štakora koji su primali TSH (Slike 5.1.15.; 5.1.16.; 5.1.17.; 5.1.18.; 5.1.19.; 5.1.20. i 5.1.21.).

Slike 5.1.15. Dinamički koštani parametri (Duljina dvostruko obilježenih površina - mm)

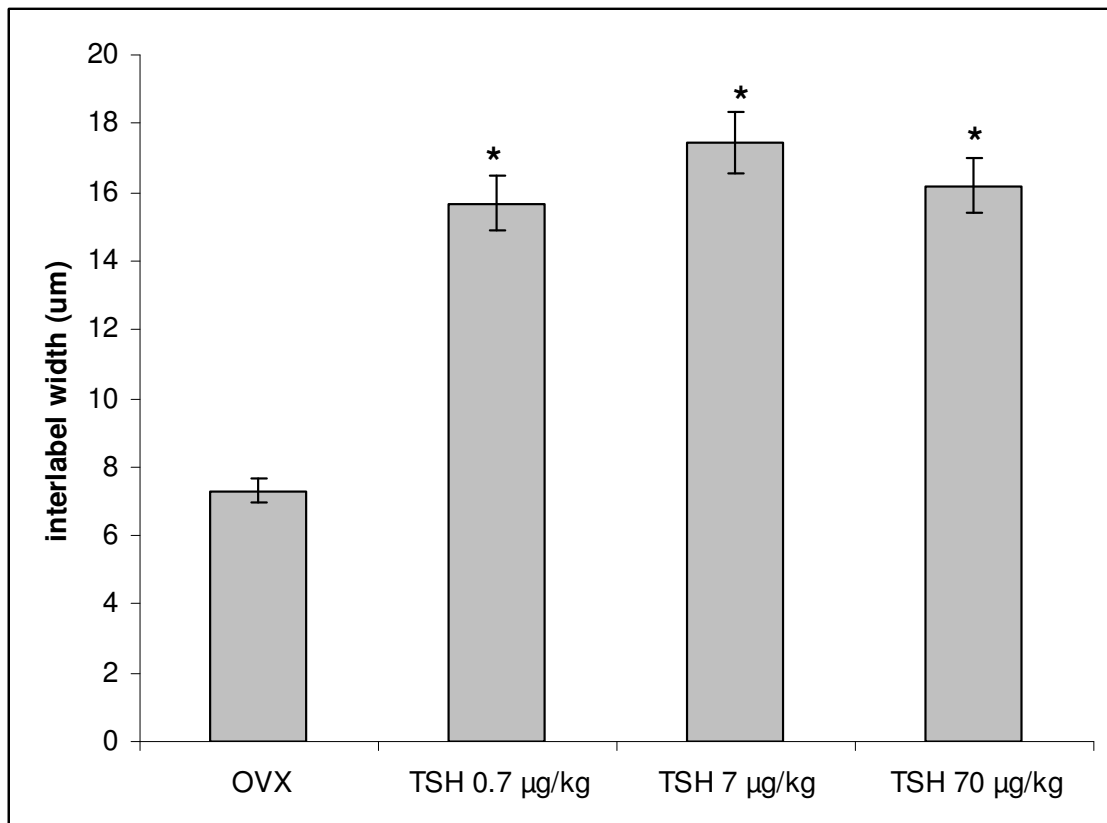




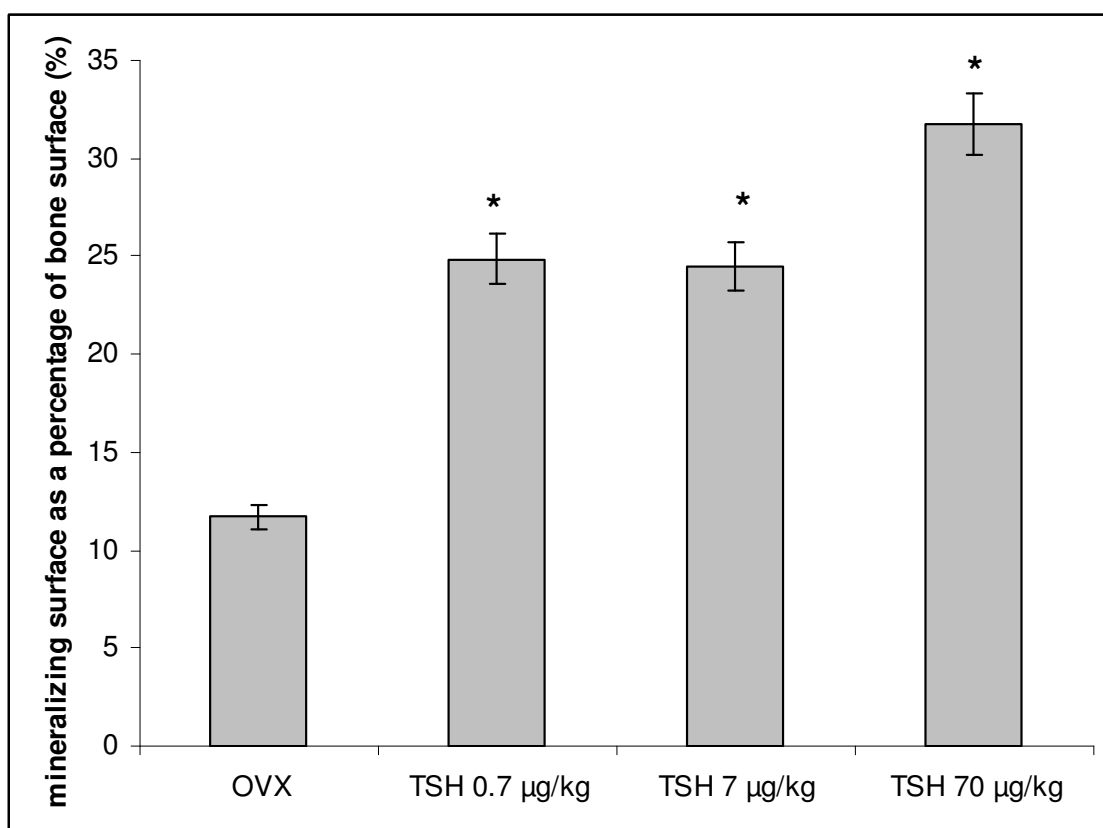
Slike 5.1.16. Dinamički koštani parametri (Debljina između obilježenih površina -  $\mu\text{m}$ )



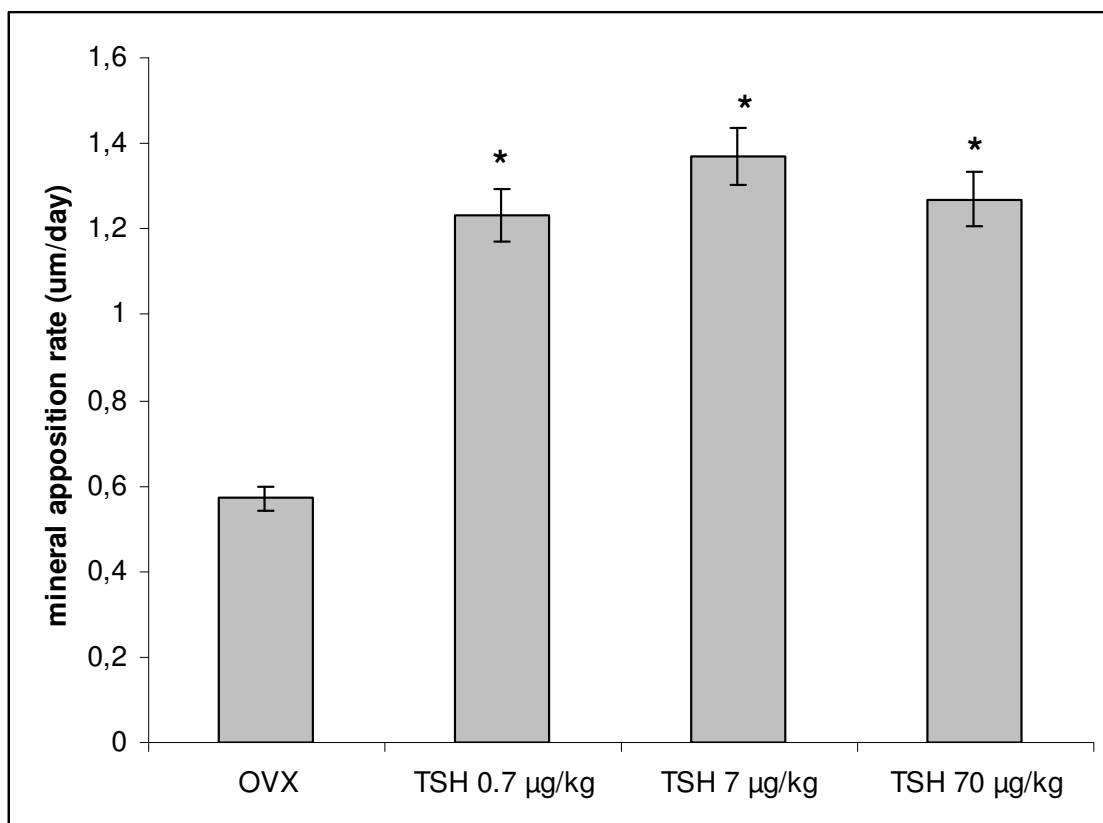
Slike 5.1.17. Dinamički koštani parametri (Širina između obilježenih površina -  $\mu\text{m}$ )



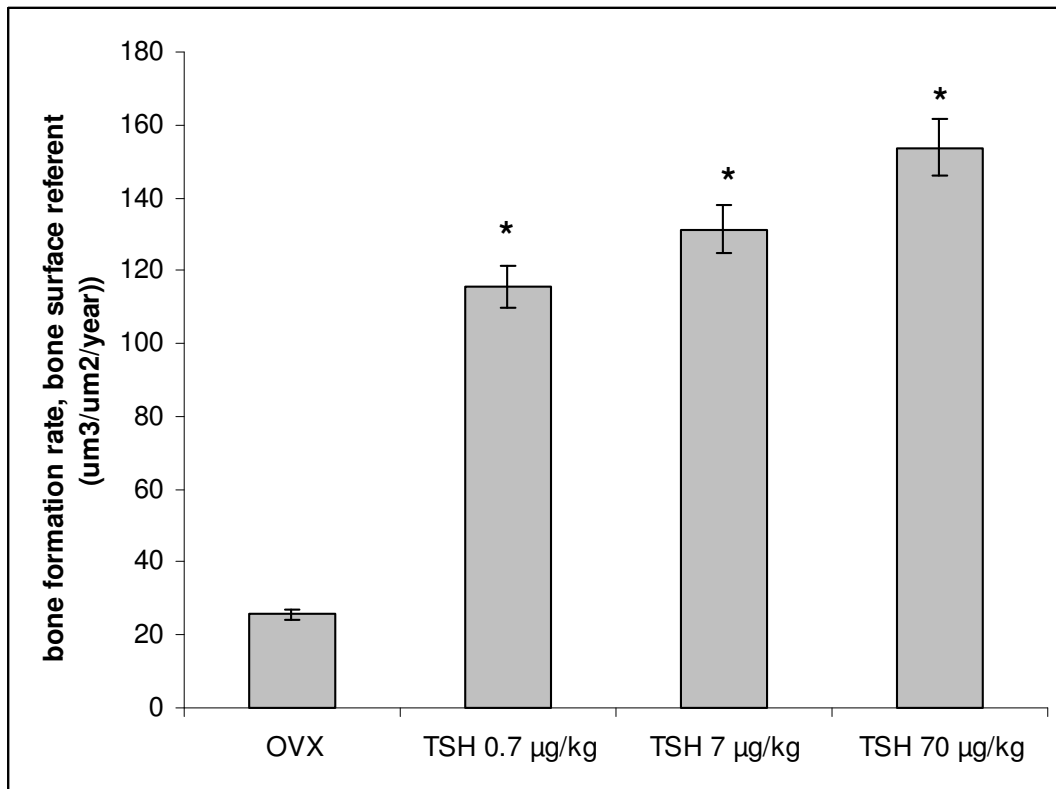
Slike 5.1.18. Dinamički koštani parametri (Mineralizirana površina kao % površine kosti)



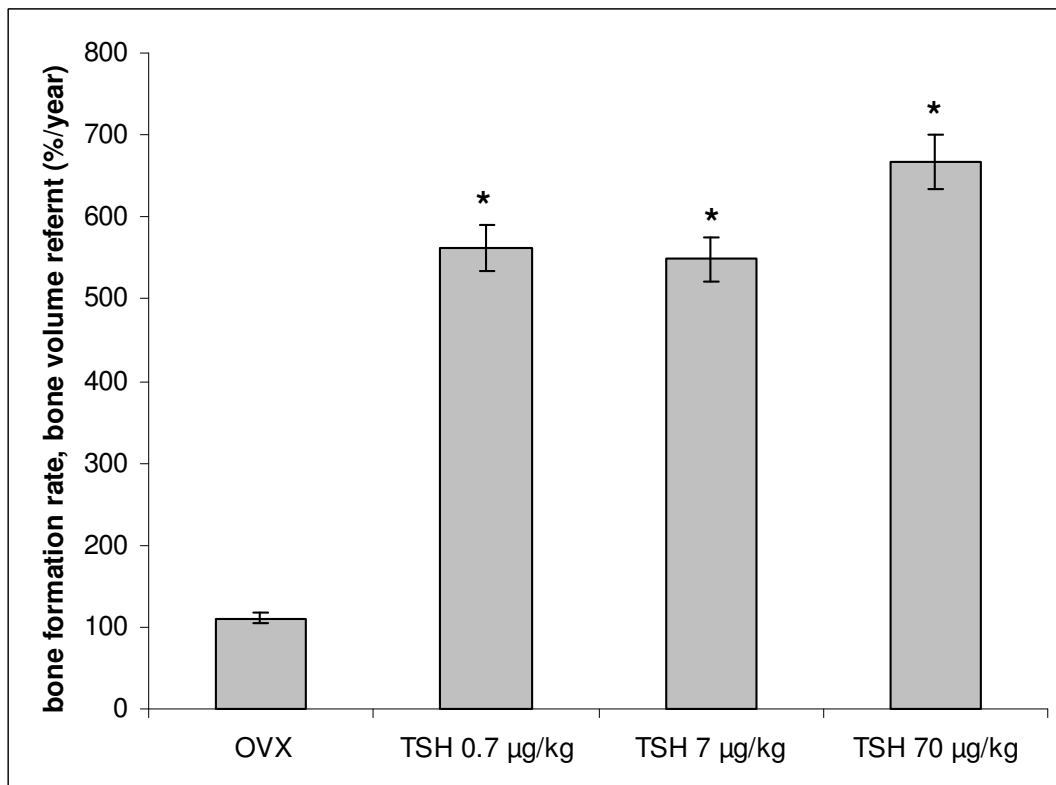
Slike 5.1.19. Dinamički koštani parametri (Brzina odlaganja minerala - µm/dnevno)



Slike 5.1.20. Dinamički koštani parametri (Brzina stvaranja kosti, referentna površina kosti -  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{godišnje}$ )



Slike 5.1.21. Dinamički koštani parametri (Brzina stvaranja kosti, referentni volumen kosti -  $\%/ \text{godišnje}$ )



Analizom serumskih parametara koštane pregradnje utvrdili smo da TSH povećava vrijednost OC u serumu te smanjuje razinu CTX raspadnih produkata kolagena kao posljedica smanjene razgradnje kosti. TSH u dozi od 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  povećao je vrijednost osteokalcina za 24%, a u dozi od 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$  za 16%, dok je vrijednost CTX u serumu pala za 31 i 36%.

Na temelju ovih istraživanja zaključili smo da humani TSH primijenjen u modelu prevencije gubitka kosti u OVX štakora, kao dobro uvriježenog modela postmenopauzalne osteoporoze, bitno utječe na sprječavanje gubitka koštane mase i to mehanizmom koje potiče stvaranje, a sprječava razaranje kosti. Kako niti jedan poznati lijek za liječenje osteoporoze ne razdvaja formativnu od resorptivne faze koštane pregradnje TSH ima veoma inovativnu učinkovitost na očuvanje koštane mase, što će biti od interesa za razvoj potencijalnog novog lijeka u liječenju osteoporoze.

## 5.2. Određivanje korelacije serumskih vrijednosti TSH s BMD u postmenopauzalnih pacijentica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti

U ispitivanju je sudjelovalo 940 žena u dobi od 60 do 81 godine prema ranije navedenim uključujućim i isključujućim kriterijima, koje nisu imale metaboličku bolest kosti ili bilo koju drugu bolest koja je mogla utjecati na mineralnu gustoću kosti, niti su uzimale lijekove za liječenje koji su mogli metabolički djelovati na kosti. Ispitane su prema opisanom protokolu za mjerenje mineralne gustoće kosti, rendgenskom snimanju grudne i slabinske kralježnice te na biokemijske parametre u serumu i urinu. Prosjek životne dobi ispitivane populacije iznosio je  $68,8 \pm 5,1$  godina ( $X \pm SD$ ), najmlađa žena imala je 60, a najstarija 81 godinu. Prosječni indeks tjelesne mase iznosio je  $25,97 \pm 3,1$   $\text{kg/m}^2$ , prosjek tjelesne težine iznosio je  $64 \pm 8,3$  kg, dok je najmršavija ispitanica imala 41, a najdeblja 93 kg. Ispitivana populacija bila je nižeg rasta, prosječne tjelesne visine od  $157 \pm 5,9$  cm. Izmjerena mineralna gustoća kosti kralježnice (0,7/-3,0) bila je značajno manja od vrata bedrene kosti (0,6/-2,4 (BMD/T vrijednost) ( $P < 0,01$ )) (Tablica 5.2.1).

Tablica 5.2.1. Deskriptivna statistika ispitivane populacije od 940 postmenopauzalnih žena za dob, tjelesnu težinu (TT), tjelesnu visinu (TV), indeks tjelesne mase (BMI), mineralnu gustoću kosti (BMD) i T vrijednost (T-sc.) slabinske kralježnice (LS) i vrata bedrene kosti (Neck).

	<b>Dob</b> (god.)	<b>TT</b> (kg)	<b>TV</b> (cm)	<b>BMI</b> ( $\text{kg/m}^2$ )	<b>BMD</b> <b>LS</b> ( $\text{g/cm}^2$ )	<b>T-sc.</b> <b>LS</b>	<b>BMD</b> <b>Neck</b> ( $\text{g/cm}^2$ )	<b>T-sc.</b> <b>Neck</b>	<b>TSH</b> (mIU/L)
<b>prosječno</b>	68,8	64	157	25,97	0,7	-3,0	0,6	-2,4	1,9
<b>min.</b>	60	41	128,5	17,74	0,45	-5,42	0,383	-4,78	<0,06
<b>maks.</b>	81	93	176,4	36,79	1,019	-0,25	1,146	2,52	86,86
<b>SD</b>	5,1	8,3	5,9	3,1	0,1	0,7	0,1	0,7	5,9
<b>SEM</b>	0,2	0,3	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2

Sve ispitanice su podijeljene u skupine prema vrijednostima TSH; tj. 5 skupina unutar normalnih vrijednosti za TSH, te skupine žena s TSH nižim od 0,3 mIU/L (hipertireoza) i skupine s TSH višim od 5,5 mIU/L (hipotireoza), kako je opisano u materijalu i metodama. Deskriptivna statistika za sve ispitanice prikazana je kao median (min-maks) za dob, indeks tjelesne mase, te mineralnu gustoću kosti lumbo-sakralne (BMD LS) kralježnice i vrata bedrene (BMD Neck) kosti (Tablica 5.2.2.).

Tablica 5.2.2. Deskriptivna statistika različitih skupina TSH vrijednosti za sve ispitanice prikazana kao median (min-maks). (statistički nema razlike među skupinama TSH za parametre Dob i BMI)

<b>TSH</b> (mIU/L)	<b>N</b> (%)	<b>Dob</b> median (min-maks)	<b>BMI</b> kg/m <sup>2</sup> (min-maks)	<b>BMD LS</b> g/cm <sup>2</sup> (min-maks)	<b>BMD Neck</b> g/cm <sup>2</sup> (min-maks)
<b>&lt;0,3</b>	<b>83</b> (8,8)	<b>70</b> (60-79)	<b>25,56</b> (18,67-32,84)	<b>0,716</b> (0,559-0,993)	<b>0,577</b> (0,383-0,819)
<b>0,3-1,00</b>	<b>398</b> (42,3)	<b>69</b> (60-80)	<b>25,96</b> (18,01-34,21)	<b>0,714</b> (0,52-1,019)	<b>0,591</b> (0,388-1,146)
<b>1,01-1,5</b>	<b>197</b> (21)	<b>68</b> (60-81)	<b>25,57</b> (18,19-32,37)	<b>0,715</b> (0,45-0,991)	<b>0,592</b> (0,383-0,852)
<b>1,51-2,00</b>	<b>108</b> (11,5)	<b>68</b> (60-80)	<b>26,72</b> (18,42-33,32)	<b>0,712</b> (0,569-1,008)	<b>0,59</b> (0,417-0,765)
<b>2,01-2,7</b>	<b>63</b> (6,7)	<b>68</b> (60-79)	<b>26,81</b> (19,96-32,49)	<b>0,716</b> (0,562-0,937)	<b>0,616</b> (0,423-0,753)
<b>2,71-5,5</b>	<b>61</b> (6,5)	<b>69</b> (60-80)	<b>26,04</b> (19,72-31,14)	<b>0,718</b> (0,563-0,935)	<b>0,575</b> (0,419-0,722)
<b>&gt;5,5</b>	<b>30</b> (3,2)	<b>66</b> (60-80)	<b>26,41</b> (17,74-36,79)	<b>0,721</b> (0,589-0,983)	<b>0,605</b> (0,417-0,702)
<b>Ukupno</b>	<b>940</b> (100)				

Od 940 ispitanica 113 (12,02%) ih je imalo TSH vrijednosti izvan normalnih granica (manje od 0,3 i više od 5,5 mIU/L). Najveći broj ispitanica s osteoporozom bio je u

skupinama niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH. 678 ispitanica (72,1%) nalazilo se u skupini s TSH  $\leq 1,5$  mIU/L. U skupini ispitanica s TSH od 1,5 do 5,5 mIU/L (gornje tri kvartile ili  $\frac{3}{4}$  gornjih vrijednosti TSH), bilo je ukupno 232 ispitanice (24,7%). Vrijednosti TSH za hipotireozu (TSH  $>5,5$  mIU/L) imalo je samo 30 ispitanica (3,2%), a za hipertireozu (TSH  $<0,3$  mIU/L) 83 ispitanice (8,8%). Dakle, veoma je izraženo grupiranje pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom u područje niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH, pa je tako 786 ispitanica (83,6%) imalo vrijednosti TSH manje od 2 mIU/L (raspon normalnih vrijednosti od 0.3 do 5.5 mU/L). Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima mineralne gustoće kosti kralježnice ( $\chi^2= 1,900$ ; df= 6; P= 0,929) i vrata bedrene kosti ( $\chi^2= 2,770$ ; df= 6; P= 0,837) u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti.

Potom smo istraživali pojavnost i učestalost osteoporoze u različitim skupinama TSH vrijednosti u odnosu na dob (prije i nakon 65. godine života), te u različitim područjima mjerenja mineralne gustoće kosti koja su karakteristična za osteoporozu. Koristili smo se raščlambom unakrsnih tablica (Crosstab analysis) za izmjeren prosjek T vrijednosti slabinske kralježnice tj. od L1 do L4 kralježka (LS) prema različitim skupinama vrijednosti TSH u 222 ispitanice mlađe od 65 godina koje su činile 23,6% svih ispitanica (Tablica 5.2.3.) i 718 ispitanica starijih od 65 godina koje su činile preostali dio od 76,4% ispitanica (Tablica 5.2.4.). U različitim dobnim skupinama i različitim područjima mjerenja našli smo sličnu raspodjelu slabije mineralizirane kosti, tj. veću učestalost u područjima niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH. U žena postmenopauzalne dobi ispod 65 godina života u područjima slabinske kralježnice nalazi se veća učestalost osteoporoze (82,1%) od učestalosti osteopenije (73,3%) za TSH vrijednosti manje od 2 mIU/L (Tablica 5.2.3.).

Tablica 5.2.3. Raščlamba unakrsnih tablica za T vrijednost (T-sc.) slabinske kralježnice (LS) različitih skupina TSH vrijednosti za ispitanice mlađe od 65 godina ( $\chi^2= 6,601$ ; df= 6; P= 0,359).

TSH (mIU/L)	LS T-sc. ( $\leq -2,5$ )		LS T-sc. ( $> -2,5$ )		Zbroj	
		%		%		%
<b>&lt;0,3</b>	16	<b>7,7</b>	1	<b>6,7</b>	<b>17</b>	<b>7,7</b>
<b>0,3-1,00</b>	83	<b>40,1</b>	5	<b>33,3</b>	<b>88</b>	<b>39,6</b>

<b>1,01-1,5</b>	48	<b>23,2</b>	3	<b>20,0</b>	<b>51</b>	<b>23,0</b>
<b>1,51-2,00</b>	23	<b>11,1</b>	2	<b>13,3</b>	<b>25</b>	<b>11,3</b>
<b>2,01-2,7</b>	17	<b>8,2</b>	0	<b>0,0</b>	<b>17</b>	<b>7,7</b>
<b>2,71-5,5</b>	14	<b>6,8</b>	2	<b>13,3</b>	<b>16</b>	<b>7,2</b>
<b>&gt;5,5</b>	6	<b>2,9</b>	2	<b>13,3</b>	<b>8</b>	<b>3,6</b>
<b>Ukupno</b>	207	<b>100,0</b>	15	<b>100,0</b>	<b>222</b>	<b>100,0</b>

U žena postmenopauzalne dobi od 65 godina kao i onih starijih od 65 godina u području slabinske kralježnice učestalost osteoporozе je manje izražena (84,6%) u odnosu na učestalost osteopenije (81,7%), bila je gotovo jednaka za TSH vrijednosti manje od 2 mIU/L (Tablica 5.2.4.). Iz navedenog se očituje da je veća razlika u učestalosti osteoporozе i osteopenije za niske i nisko normalne vrijednosti TSH u mlađoj (8,8%) u odnosu na stariju populaciju (3%) postmenopauzalne dobi, iako razlike nisu statistički značajne ( $P > 0,05$ ).

Tablica 5.2.4. Rasčlamba unakrsnih tablica za T vrijednost slabinske kralježnice različitih skupina TSH vrijednosti za ispitanice dobi 65 godina i starije ( $\chi^2 = 2,434$ ;  $df = 6$ ;  $P = 0,876$ ).

<b>TSH</b> (mIU/L)	<b>LS T-sc.</b> ( $\leq -2,5$ )	<b>%</b>	<b>LS T-sc.</b> ( $> -2,5$ )	<b>%</b>	<b>Zbroj</b>	<b>%</b>
<b>&lt;0,3</b>	57	<b>9,2</b>	9	<b>9,2</b>	<b>66</b>	<b>9,2</b>
<b>0,3-1,00</b>	266	<b>42,9</b>	44	<b>44,9</b>	<b>310</b>	<b>43,2</b>
<b>1,01-1,5</b>	128	<b>20,6</b>	18	<b>18,4</b>	<b>146</b>	<b>20,3</b>
<b>1,51-2,00</b>	74	<b>11,9</b>	9	<b>9,2</b>	<b>83</b>	<b>11,6</b>
<b>2,01-2,7</b>	38	<b>6,1</b>	8	<b>8,2</b>	<b>46</b>	<b>6,4</b>
<b>2,71-5,5</b>	37	<b>6,0</b>	8	<b>8,2</b>	<b>45</b>	<b>6,3</b>
<b>&gt;5,5</b>	20	<b>3,2</b>	2	<b>2,0</b>	<b>22</b>	<b>3,1</b>
<b>Ukupno</b>	620	<b>100,0</b>	98	<b>100,0</b>	<b>718</b>	<b>100,0</b>



U postmenopauzalnih žena ispitivane populacije s postavljenom dijagnozom na osnovu DXA mjerenja mineralne gustoće kosti u slabinskoj kralježnici i vratu bedrene kosti, osteoporoza je potvrđena u području slabinske kralježnice u 93,2% žena mlađih od 65 godina i 86,4% postmenopauzalnih žena starijih od 65 godina, odnosno za ukupnu ispitivanu populaciju to je iznosilo 88% postmenopauzalnih žena.

Također smo koristili raščlambu unakrsnih tablica za izmjerene T vrijednosti vrata bedrene kosti (Neck) prema različitim skupinama vrijednosti TSH u ispitanica mlađih od 65 godina (Tablica 5.2.5.) i ispitanica od 65 godina i starijih od 65 godina života (Tablica 5.2.6.), kako bismo utvrdili moguću razliku u učestalosti osteoporoze u različitim dobnim skupinama u odnosu na skupine vrijednosti TSH. U žena postmenopauzalne dobi mlađih od 65 godina u području vrata bedrene kosti našli smo nešto veću učestalost osteoporoze (83,5%), od učestalosti osteopenije (80,1%) za TSH vrijednosti manje od 2 mIU/L (Tablica 5.2.5.).

Tablica 5.2.5. Raščlamba unakrsnih tablica za T vrijednost vrata bedrene kosti (Neck) različitih skupina TSH vrijednosti za ispitanice mlađe od 65 godina ( $\chi^2=3,829$ ;  $df=6$ ;  $P=0,7$ ).

<b>TSH</b> (mIU/L)	<b>Neck T-sc.</b> ( $\leq -2,5$ )		<b>Neck T-sc.</b> ( $> -2,5$ )		<b>Zbroj</b>	
		%		%		%
<b>&lt;0,3</b>	6	<b>6,3</b>	11	<b>8,7</b>	<b>17</b>	<b>7,7</b>
<b>0,3-1,00</b>	40	<b>41,7</b>	48	<b>38,1</b>	<b>88</b>	<b>39,6</b>
<b>1,01-1,5</b>	23	<b>24,0</b>	28	<b>22,2</b>	<b>51</b>	<b>23,0</b>
<b>1,51-2,00</b>	11	<b>11,5</b>	14	<b>11,1</b>	<b>25</b>	<b>11,3</b>
<b>2,01-2,7</b>	4	<b>4,2</b>	13	<b>10,3</b>	<b>17</b>	<b>7,7</b>
<b>2,71-5,5</b>	8	<b>8,3</b>	8	<b>6,3</b>	<b>16</b>	<b>7,2</b>
<b>&gt;5,5</b>	4	<b>4,2</b>	4	<b>3,2</b>	<b>8</b>	<b>3,6</b>
<b>Ukupno</b>	96	<b>100,0</b>	126	<b>100,0</b>	<b>222</b>	<b>100,0</b>

Tablica 5.2.6. Raščlamba unakrsnih tablica za T vrijednost vrata bedrene kosti (Neck) različitih skupina TSH vrijednosti za ispitanice dobi 65 godina i starije ( $\chi^2=3,241$ ;  $df=6$ ;  $P=0,778$ ).

<b>TSH</b> (mIU/L)	<b>Neck T-sc.</b> ( $\leq -2,5$ )	<b>%</b>	<b>Neck T-sc.</b> ( $> -2,5$ )	<b>%</b>	<b>Zbroj</b>	<b>%</b>
<b>&lt;0,3</b>	41	<b>10,6</b>	25	<b>7,6</b>	<b>66</b>	<b>9,2</b>
<b>0,3-1,00</b>	161	<b>41,5</b>	149	<b>45,2</b>	<b>310</b>	<b>43,2</b>
<b>1,01-1,5</b>	77	<b>19,8</b>	69	<b>20,9</b>	<b>146</b>	<b>20,3</b>
<b>1,51-2,00</b>	46	<b>11,9</b>	37	<b>11,2</b>	<b>83</b>	<b>11,6</b>
<b>2,01-2,7</b>	25	<b>6,4</b>	21	<b>6,4</b>	<b>46</b>	<b>6,4</b>
<b>2,71-5,5</b>	27	<b>7,0</b>	18	<b>5,5</b>	<b>45</b>	<b>6,3</b>
<b>&gt;5,5</b>	11	<b>2,8</b>	11	<b>3,3</b>	<b>22</b>	<b>3,1</b>
<b>Ukupno</b>	388	<b>100,0</b>	330	<b>100,0</b>	<b>718</b>	<b>100,0</b>

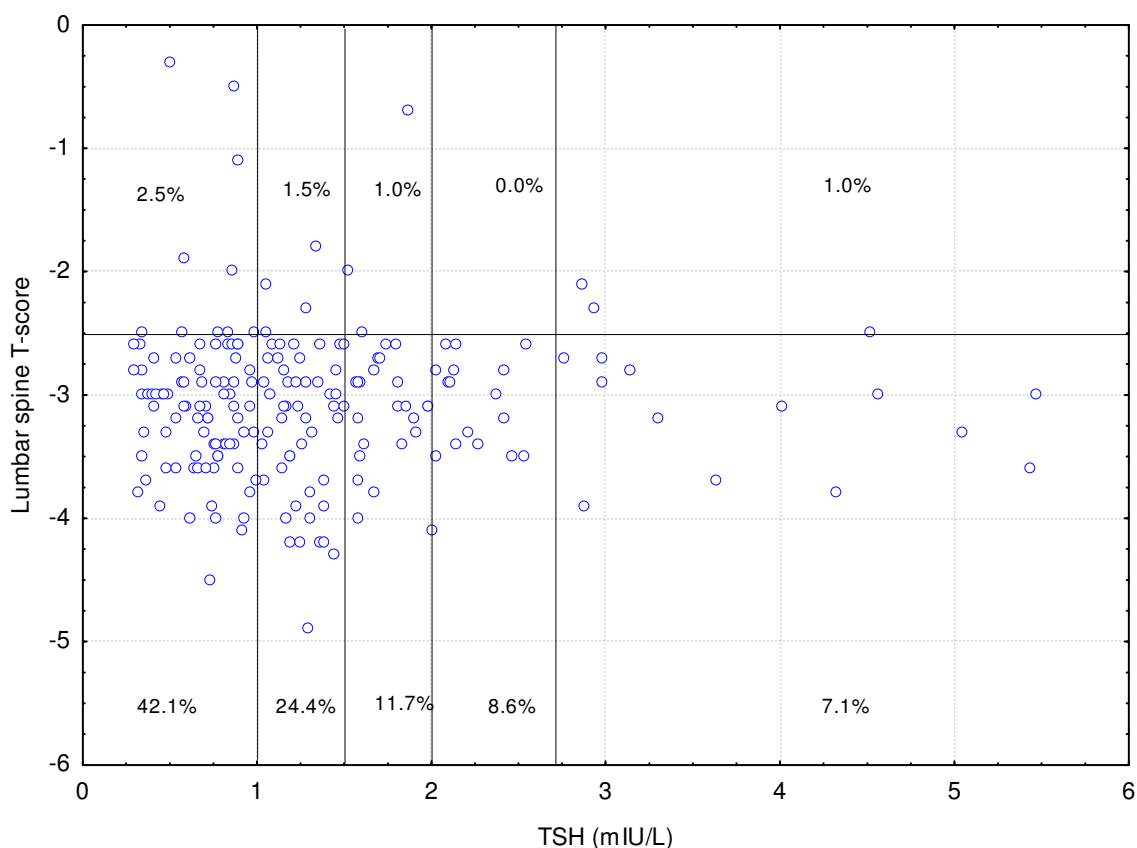
U žena postmenopauzalne dobi 65 godina kao i starijih od 65 godina u područjima vrata bedrene kosti učestalost osteoporoze je manja (83,8%) u odnosu na učestalost osteopenije (84,9%) za TSH vrijednosti manje od 2 mIU/L (Tablica 5.2.6.). Iz navedenog zaključujemo da nema razlika u učestalosti osteoporoze i osteopenije u području vrata bedrene kosti za niske i nisko normalne vrijednosti TSH u mlađoj (3,4%) u odnosu na stariju (-1,1%) populaciju postmenopauzalne dobi ( $P > 0,05$ ). Učestalost sniženih vrijednosti mineralne gustoće kosti u žena s osteoporozom i u onih s osteopenijom puno je veća u postmenopauzalnih žena s niskim i nisko normalnim TSH vrijednostima (TSH  $< 2,0$  mIU/L) neovisno o dobi i području mjerenja. Učestalost iznosi 83,5 i 83,8 % (LS i neck) za pacijentice mlađe od 65 godina, a 80,1 i 84,9% za pacijentice u dobi 65 i više godina, iako  $\chi^2$  testom nije utvrđena statistička značajnost. Visoki postotak učestalosti u skupini niskih TSH vrijednosti bez statističke značajnosti tumačimo prethodnim selekcioniranjem postmenopauzalnih žena s niskom mineralnom gustoćom kosti kod kojih nije moguće statistički dokazati razliku koja je deskriptivno vrlo jasna. To je u skladu s prethodno objavljenim opažanjima na ukupnoj populaciji žena različite životne dobi i mineralne gustoće kosti.

U postmenopauzalnih žena ispitivane populacije s postavljenom dijagnozom na osnovu DXA mjerenja mineralne gustoće kosti u slabinskoj kralježnici i u vratu bedrene kosti, osteoporoza je potvrđena u području vrata bedrene kosti u 43,2% žena mlađih od 65 godina i u 54% postmenopauzalnih žena starijih od 65 godina, odnosno za ukupnu ispitivanu populaciju to je iznosilo 51,5% postmenopauzalnih žena. Učestalost osteoporoze vrata bedrene kosti značajno je manja bez obzira na životnu dob što je sukladno patofiziološkom mehanizmu nastanka i progresije osteoporoze, naime osteoporoza je ranije izražena u dijelu skeleta koji se brže pregrađuje tj. u spužvastoj kosti koja čini najveći dio koštane strukture kralježnice.

Obzirom na veliki raspon TSH vrijednosti ispod i iznad granica normale (od <0,06 do 86,86 mIU/L) u slijedeću raščlambu uključene su samo ispitanice koje su imale TSH vrijednosti unutar očekivanih granica normale (0,3 do 5,5 mIU/L TSH), što znači njih 827 odnosno 88% od ukupnog broja. Da bi izbjegli sličan način prikazivanja, a kako se radi o značajno manjem rasapu TSH vrijednosti koristili smo se raščlambom unakrsnih tablica i prikazom podataka točkastim dijagramima na kojima je vrlo očito grupiranje nižih BMD vrijednosti u donjoj trećini TSH vrijednosti (od 0,3 do 2 mIU/L) tj. u području nisko normalnih vrijednosti. Grupiranje TSH vrijednosti u 5 skupina, kvazikvintila, provedeno je na taj način da smo sačinili više podskupina nisko normalnih TSH vrijednosti, kako bi se statistička analiza provela što pouzdanije u području najvećeg grupiranja podataka. Prve tri skupine: od 0,3-1,0 mIU/L, zatim 1,01-1,5 mIU/L i 1,51-2,0 mIU/L čine donju trećinu normalnih TSH vrijednosti. Ako im se pridruži i četvrta skupina (2,01-2,7 mIU/L) u raščlambi dobivamo donju polovinu (50%) normalnih TSH vrijednosti, a 5. skupina samostalno čini gornju polovinu normalnih TSH vrijednosti (2,71-5,5 mIU/L).

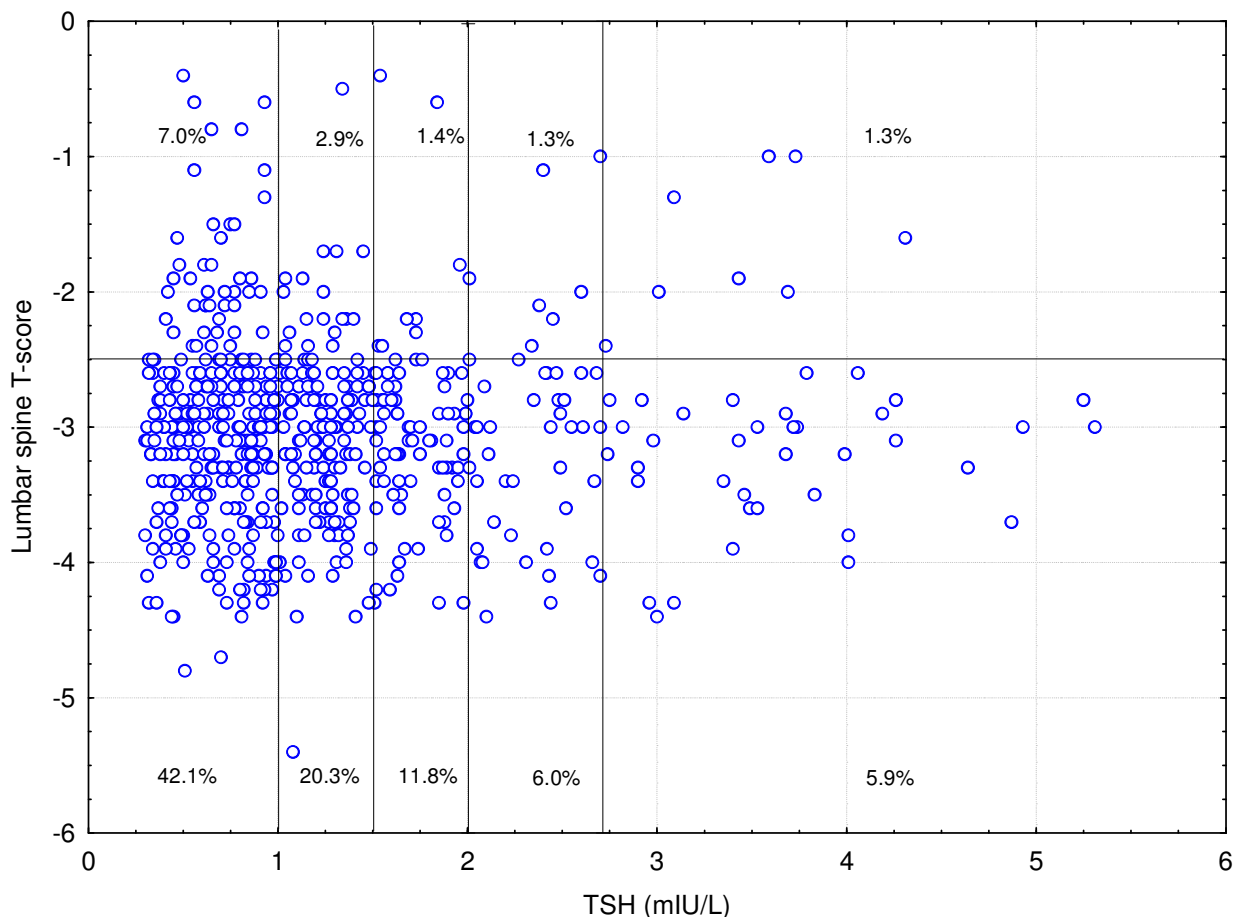
Skupinu ispitanica mlađih od 65 godina činilo je 197 postmenopauzalnih žena s osteoporozom (23,8%). Od ukupnog broja u toj skupini samo su 33 žene (16,8%) imale vrijednosti TSH u području gornje dvije trećine normalnih vrijednosti (2,01-5,5 mIU/L), dok su čak 164 postmenopauzalne žene s osteoporozom (83,2%) navedene dobi bile u području nisko normalnih TSH vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L), tj. u donjoj trećini normalnih TSH vrijednosti (Slika 5.2.1.). U žena postmenopauzalne dobi mlađih od 65 godina u području slabinske kralježnice našli smo gotovo istu učestalost osteoporoze (83,2%), i osteopenije (83,3%) za TSH vrijednosti u području donje trećine normalnih vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području slabinske kralježnice,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike između skupina žena u dobi manjoj od 65 godina ( $P = 0,655$ ) (Slika 5.2.1.).

Slika 5.2.1. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području slabinske kralježnice (Lumbar spine T-sc.) u različitim skupinama TSH vrijednosti za ispitanice u dobi manjoj od 65 godina. (n=197;  $\chi^2= 2,440$ ; df= 4; P= 0,655).



Veću skupinu ispitanica, 65 godina i više, činilo je 630 postmenopauzalnih žena (76,2%) tražene populacije. Od navedenog broja samo je 91 žena (14,4%) bila u području gornje dvije trećine normalnih vrijednosti TSH (2,01-5.5 mIU/L), dok je čak 539 žena (85,6%) navedene dobi imalo TSH u području nisko normalnih vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L) (Slika 5.2.2.). U žena postmenopauzalne dobi 65 godina i više u području slabinske kralježnice našli smo nešto veću učestalost osteoporoze (86,2%), od osteopenije (81,6%) za TSH vrijednosti u području donje trećine normalnih vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području slabinske kralježnice,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike između skupina žena u dobi od 65 godina i više (P = 0,732) (Slika 5.2.2.).

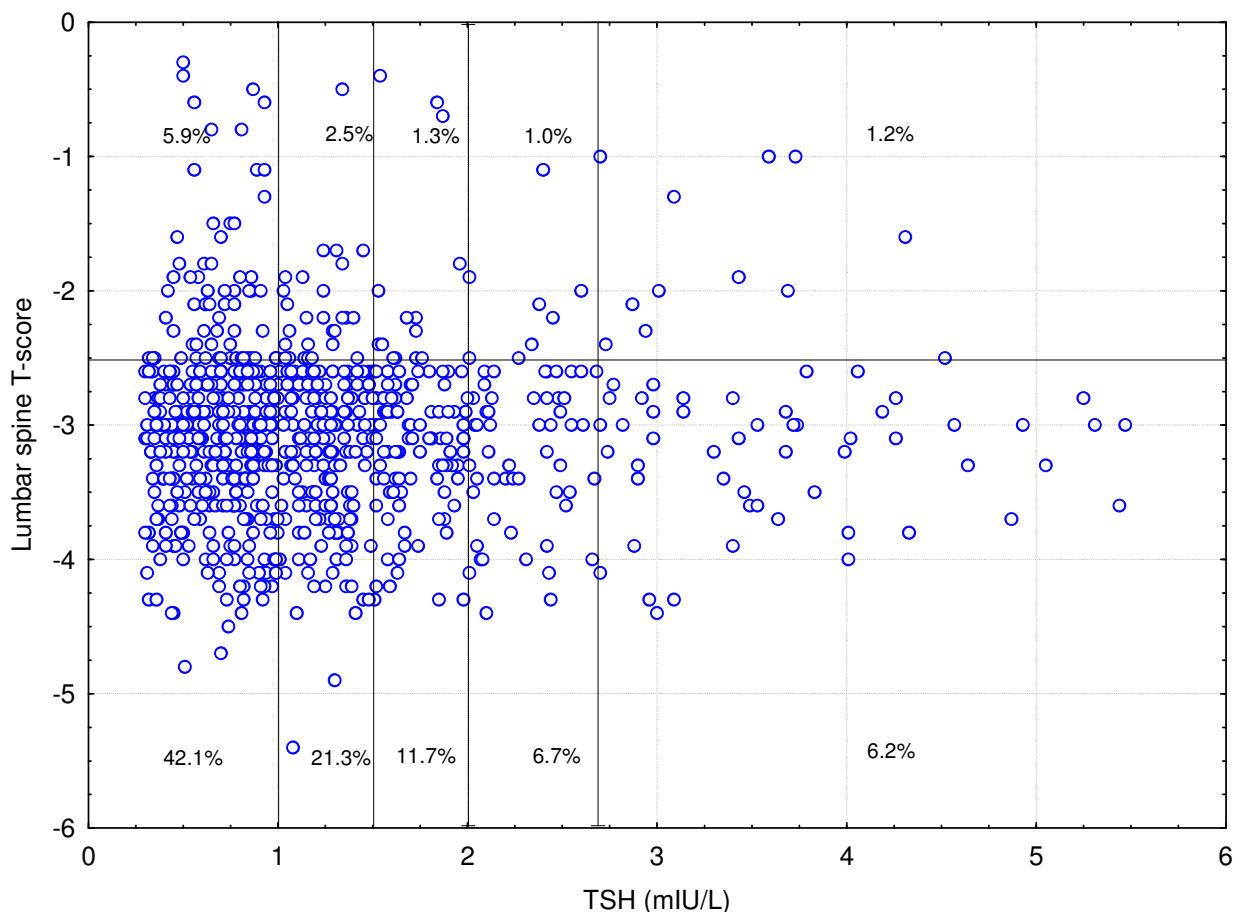
Slika 5.2.2. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području slabinske kralježnice u različitim skupinama TSH vrijednosti za ispitanice u dobi 65 godina i više (n=630;  $\chi^2=2,019$ ; df= 4; P= 0,732).



Od ukupnog broja postmenopauzalnih žena s DXA potvrđenom osteoporozom i TSH vrijednosti unutar očekivanih granica normale, samo su 124 žene (15%) bile u području gornje dvije trećine normalnih vrijednosti TSH, dok su čak 703 žene (85%) bile u području nisko normalnih TSH vrijednosti (Slika 5.2.3.), što se ne razlikuje u odnosu na rezultate u dobnim skupinama (Slika 5.2.1. i slika 5.2.2.).

U svih postmenopauzalnih žena, bez obzira na dob, u području slabinske kralježnice nalazi se nešto veća učestalost osteoporoze (85,4%) od osteopenije (81,8%) za TSH u području donje trećine normalnih vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području slabinske kralježnice,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike među skupinama (P= 0,761) (Slika 5.2.3.).

Slika 5.2.3. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području slabinske kralježnice u različitim skupinama TSH vrijednosti za sve ispitanice, bez obzira na dob (n=827;  $\chi^2=1,862$ ; df= 4; P= 0,761).



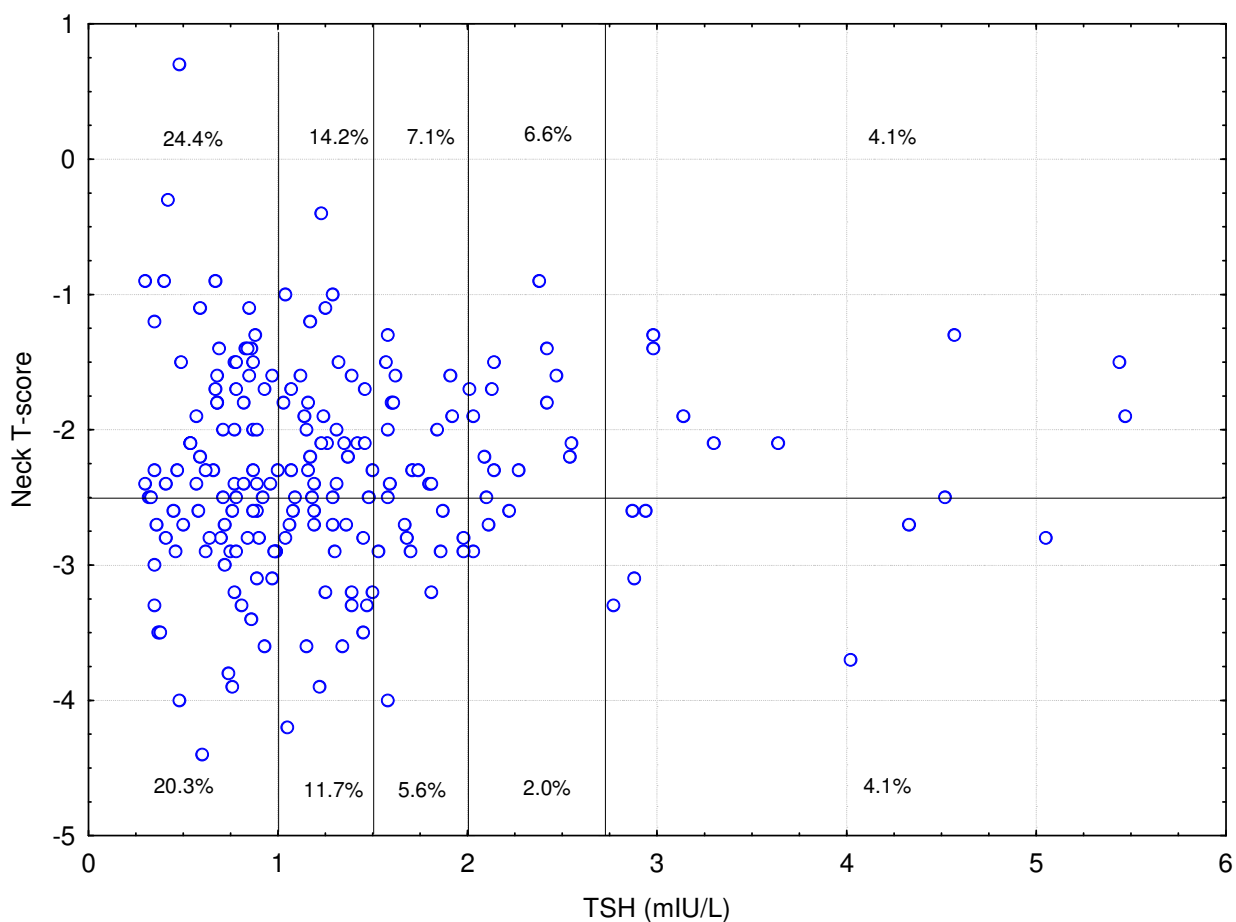
U postmenopausalnih žena ispitivane populacije s klinički postavljenom dijagnozom na osnovu kriterija SZO-a tj. T vrijednosti na DXA mjerenju, a koje su imale normalni raspon vrijednosti TSH (0,3-5,5 mIU/L), osteoporoza je bila potvrđena DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti u području slabinske kralježnice u 93,9% žena mlađih od 65 godina i u 86,2% postmenopausalnih žena u dobi od 65 godina i više, odnosno za ukupnu populaciju to je iznosilo 88% postmenopausalnih žena. Visoka učestalost potvrđene osteoporoze DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti u slabinskoj kralježnici potvrđuje da je navedeno područje mjerenja visoko specifično za dijagnozu osteoporoze.

U postmenopausalnih žena ispitivane populacije s postavljenom dijagnozom osteoporoze na osnovu DXA mjerenja mineralne gustoće kosti s normalnim vrijednostima TSH u serumu, osteoporoza je bila potvrđena DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti u

području vrata bedrene kosti u 43,7% žena mlađih od 65 godina (Tablica 5.2.5. i Slika 5.2.4.) i u 53,3% postmenopauzalnih žena u dobi 65 godina i više (Tablica 5.2.6. i Slika 5.2.5.), odnosno za ukupnu populaciju to je iznosilo 51% postmenopauzalnih žena (Slika 5.2.6.). Učestalost osteoporozе vrata bedrene kosti značajno je manja bez obzira na životnu dob što je sukladno patofiziološkom mehanizmu nastanka i progresije osteoporozе.

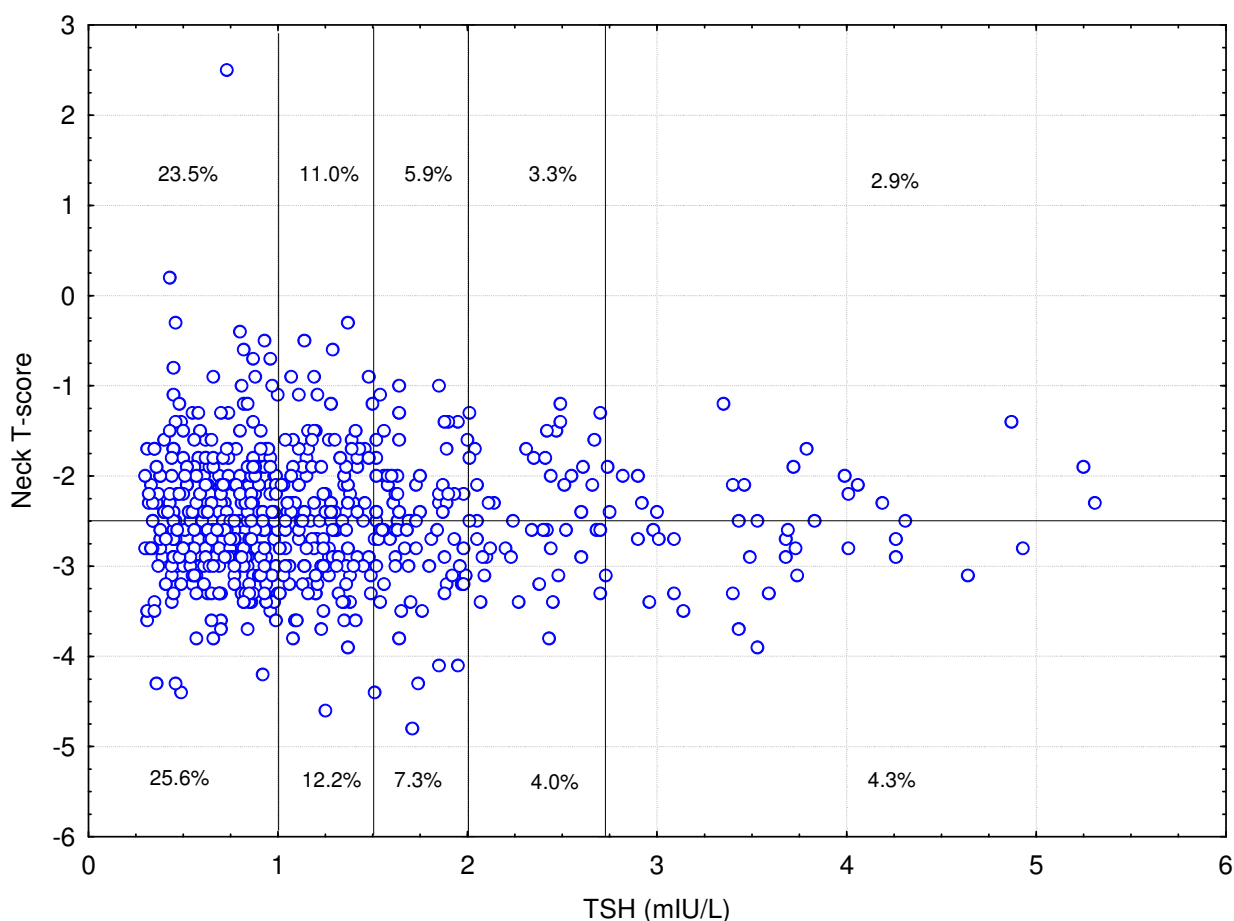
U žena postmenopauzalne dobi mlađih od 65 godina u području vrata bedrene kosti našli smo nešto veću učestalost osteoporozе (86,1%) od osteopenije (81,1%) u području donje trećine normalnih TSH vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području vrata bedrene kosti,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike među skupinama životne dobi manje od 65 godina ( $P=0,521$ ) (Slika 5.2.4.).

Slika 5.2.4. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području vrata bedrene kosti (Neck T-sc.) u različitim skupinama TSH vrijednosti za ispitanice u dobi manjoj od 65 godina (n=197;  $\chi^2= 3,221$ ; df= 4;  $P= 0,521$ ).



U žena postmenopauzalne dobi 65 godina i više u području vrata bedrene kosti nalazi se nešto manja učestalost osteoporoze (84,5%) od osteopenije (86,7%) u području donje trećine normalnih TSH vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području vrata bedrene kosti,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike među skupinama dobi 65 godina i više ( $P= 0,882$ ) (Slika 5.2.5.).

Slika 5.2.5. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području vrata bedrene kosti u različitim skupinama TSH vrijednosti za ispitanice u dobi 65 godina i više ( $n=630$ ;  $\chi^2= 1,175$ ;  $df= 4$ ;  $P= 0,882$ ).

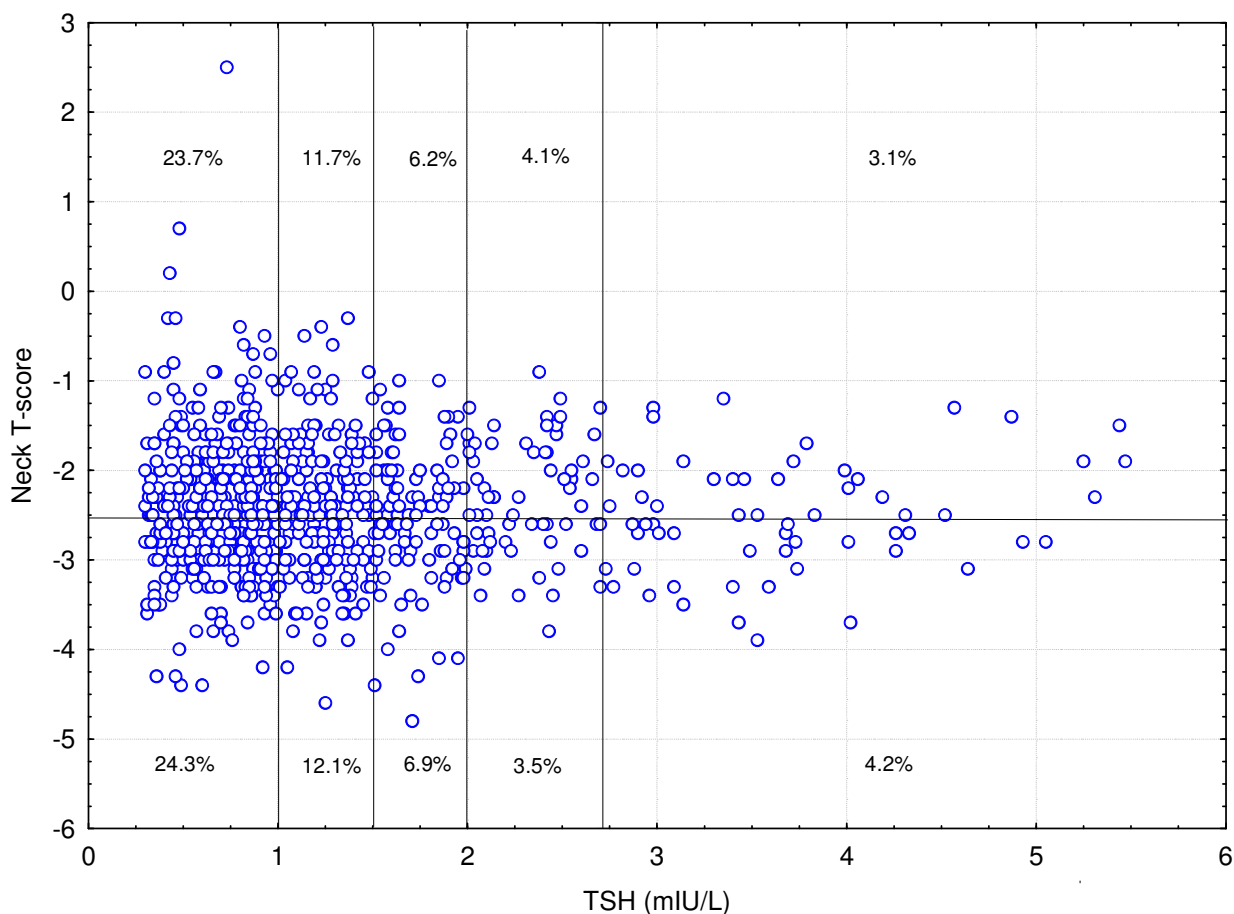


U svih postmenopauzalnih žena, bez obzira na dob, u području vrata bedrene kosti našli smo gotovo jednaku učestalost osteoporoze (84,8%) i osteopenije (85,2%) u području donje trećine normalnih TSH vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Raščlambom unakrsnih tablica



različitih skupina TSH vrijednosti i mineralne gustoće kosti u području vrata bedrene kosti,  $\chi^2$  testom nismo našli statistički značajne razlike među skupinama ( $P= 0,777$ ) (Slika 5.2.6.).

Slika 5.2.6. Točkasti dijagram za T vrijednosti u području vrata bedrene kosti u različitim skupinama TSH vrijednosti za sve ispitanice, bez obzira na dob ( $n=827$ ;  $\chi^2= 1,775$ ;  $df= 4$ ;  $P= 0,777$ ).



Ukupnu skupinu svih ispitanica, bez obzira na dob, činilo je 827 postmenopausalnih žena s DXA potvrđenom osteoporozom u području slabinske kralježnice ili vrata bedrene kosti. Od ukupnog broja samo su 124 žene (15%) bile u području gornje dvije trećine normalnih vrijednosti TSH (2,01-5,5 mIU/L), dok su čak 703 žene (85%) bile u području nisko normalnih TSH vrijednosti (0,3-2,0 mIU/L). Značajno je češće osteoporoza bila potvrđena DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti u području slabinske kralježnice (88%), nego u području vrata bedrene kosti (51%), što slabinsku kralježnicu čini specifičnijim i senzitivnijim dijagnostičkim kriterijem.

U različitim dobnim skupinama i različitim područjima našli smo sličnu raspodjelu nižih vrijednosti mineraliziranosti kosti, tj. veću učestalost u područjima niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH. Iako nismo dokazali statističku značajnost zbog visoko selekcionirane populacije, šest od sedam ispitanica s dijagnozom osteoporoze imalo je nisko normalne vrijednosti TSH (0,3-2,0 mIU/L) u serumu.

### 5.3. Određivanje korelacije serumskih vrijednosti TSH i učestalosti prijeloma kralježaka u postmenopauzalnih pacijentica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti

U 685 ispitanica s postmenopauzalnom osteoporozom na temelju DXA mjerenja mineralne gustoće kosti, učinili smo i rendgensko snimanje grudnog i slabinskog dijela kralježnice u lateralnoj projekciji u svrhu očitavanja prisutnosti kompresivnih (osteoporotičnih) prijeloma metodom prema Genantu (301). Istražili smo da li broj prijeloma u području kralježnice korelira s vrijednostima TSH u serumu. Antropometrijski podaci 685 ispitanica s postmenopauzalnom osteoporozom u kojih smo očitali rendgenogram grudne i slabinske (Th-L) kralježnice prikazani su u Tablici 5.3.1., a pokazuju da je 337 žena (49,2%) imalo najnižu normalnu vrijednost TSH (prva kvazikvintila u rasponu od 0.3-1.0 mIU/L) te je prema skupinama povećanih vrijednosti TSH broj bolesnica s osteoporotičnim prijelomima značajno opadao, slično kao i u mjerenoj mineralnoj gustoći kosti (BMD).

Tablica 5.3.1. Prikazuje antropometrijske rezultate ispitanica s postmenopauzalnom osteoporozom i rendgenogramom Th-L kralježnice u odnosu na različite skupine vrijednosti TSH (kvazikvintile) prikazane kao n (%) ili  $X \pm SD$ .

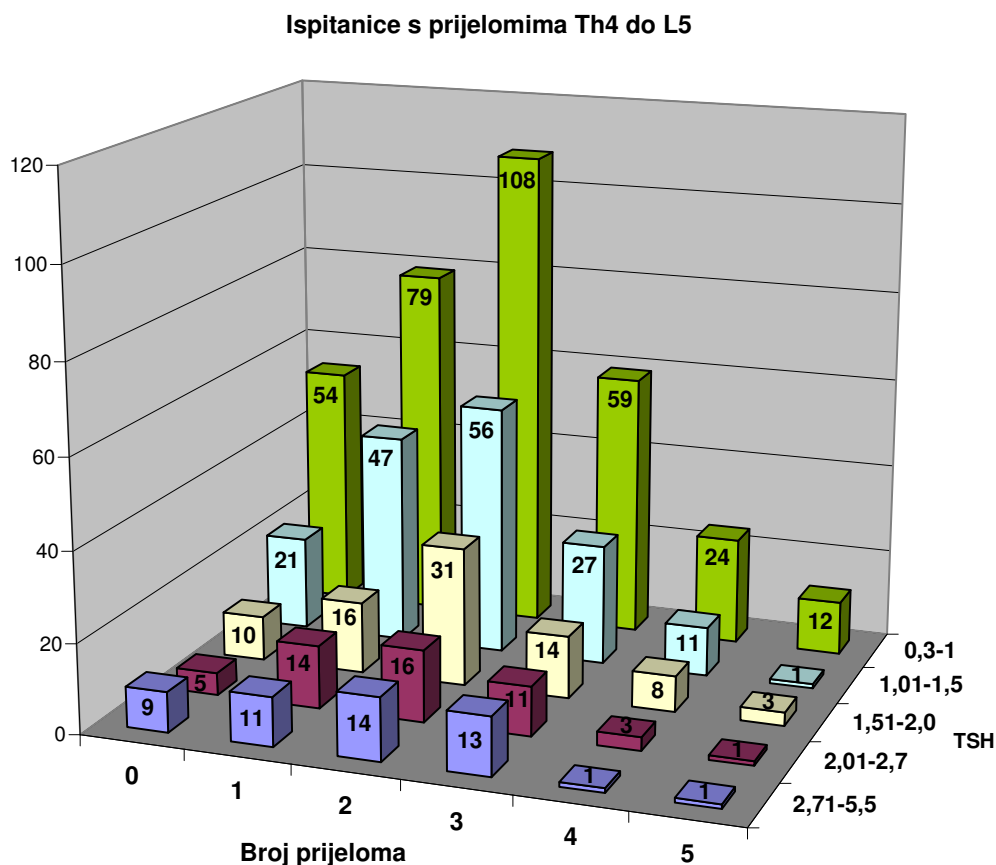
<b>TSH (mIU/L)</b>	<b>Q1 (0.3-1.0)</b>	<b>Q2 (1.01-1.5)</b>	<b>Q3 (1.51-2.0)</b>	<b>Q4 (2.01-2.7)</b>	<b>Q5 (2.71-5.5)</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Broj ispitanica (%)</b>	337 (49,2)	163 (23,8)	83 (12,1)	52 (7,6)	50 (7,3)	685 (100)
<b>Dob</b>	72.7 $\pm$ 5.1	72.2 $\pm$ 5.0	72.7 $\pm$ 4.7	72.4 $\pm$ 5.3	73.6 $\pm$ 5.8	72.6 $\pm$ 5.1
<b>TT (kg)</b>	63.9 $\pm$ 8.3	63.4 $\pm$ 8.1	64.8 $\pm$ 7.5	66.7 $\pm$ 9.0	64.1 $\pm$ 8.0	64.1 $\pm$ 8.2
<b>TV (cm)</b>	156.9 $\pm$ 5.7	157.5 $\pm$ 5.9	156.5 $\pm$ 5.6	157.4 $\pm$ 6.6	156.8 $\pm$ 4.9	157.0 $\pm$ 5.8
<b>BMI</b>	25.9 $\pm$ 3.0	25.6 $\pm$ 3.0	26.4 $\pm$ 2.8	26.9 $\pm$ 2.9	26.1 $\pm$ 3.0	26.0 $\pm$ 3.0
<b>BMD L1-L4</b>	0.712 $\pm$ 0.073	0.707 $\pm$ 0.063	0.707 $\pm$ 0.065	0.703 $\pm$ 0.079	0.713 $\pm$ 0.071	0.710 $\pm$ 0.070
<b>BMD Neck</b>	0.601 $\pm$ 0.082	0.601 $\pm$ 0.077	0.590 $\pm$ 0.074	0.607 $\pm$ 0.071	0.588 $\pm$ 0.070	0.599 $\pm$ 0.078

Ostali antropometrijski podaci pokazuju da su dob, tjelesna težina, tjelesna visina, indeks tjelesne mase, mineralna gustoća slabinske kralježnice (L1-L4) i vrata bedrene kosti (Neck) bili jednaki bez obzira na vrijednosti TSH u serumu. U 583 od ukupno 685 ispitanica s osteoporozom i radiološkim nalazom Th-L kralježnice (85,1%) vrijednosti TSH bile su niže od 2.01 mU/L. Odnosno u 500 od ukupno 685 ispitanica s osteoporozom (73%) našli smo vrijednosti TSH niže od 1,5 mU/L (Tablica 5.3.1.).

Od ukupno 680 žena s osteoporozom, 99 (14,6%) nije imalo osteoporotičnih prijeloma kralježaka, a ostalih 581 (85,4%) imalo je 1, 2, 3, 4 ili 5 i više kompresivnih prijeloma grudnih ili slabinskih kralježaka (Slika 5.3.1.). U skupini s najnižom vrijednosti TSH (0,3-1,0 mIU/L) bilo je ukupno 282 prijeloma grudnih i slabinskih kralježaka (48,5%). Ako su ubroje prijelomi u pacijentica čiji je TSH bio nisko normalan (0,3-2,0 mIU/L), tada smo imali 496 pacijentice s prijelomom bar jednog kralježka (85,4%) što je vrlo visoka učestalost. U navedenoj skupini najviše je bilo pacijentica koje su imale 2 prijeloma (33,6%), zatim onih s jednim prijelomom (24,4%) i onih s 3 prijeloma (17,2%). Ispitanica s četiri prijeloma u skupini nisko normalnih vrijednosti TSH bilo je 43 (7,4%) od ukupnog broja prijeloma (581). Možemo zaključiti da je većina od 581 prijeloma grudne i slabinske kralježnice (48,5%) bila u najnižoj skupini TSH vrijednosti, tj. u prvoj kvazikvintili (0,3-1,0 mIU/L), a ako se ubroje i ispitanice s TSH vrijednostima do 2 mIU/L, što čini nisko normalne vrijednosti TSH, tada to iznosi 85,4%. U području gornje 2/3 normalnih TSH vrijednosti (2,01-5,5 mIU/L) bilo je svega 85 ispitanica s kompresivnim prijelomom (14,6%) ili tek svaka 7. pacijentica (Slika 5.3.1.).

Slika 5.3.1. Prikazuje pojavnost i učestalost radiološki očitanih prijeloma grudnih i slabinskih kralježaka (Th4 do L5) u apsolutnim vrijednostima (slika A) i postocima (tablica B) u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti.

A



B

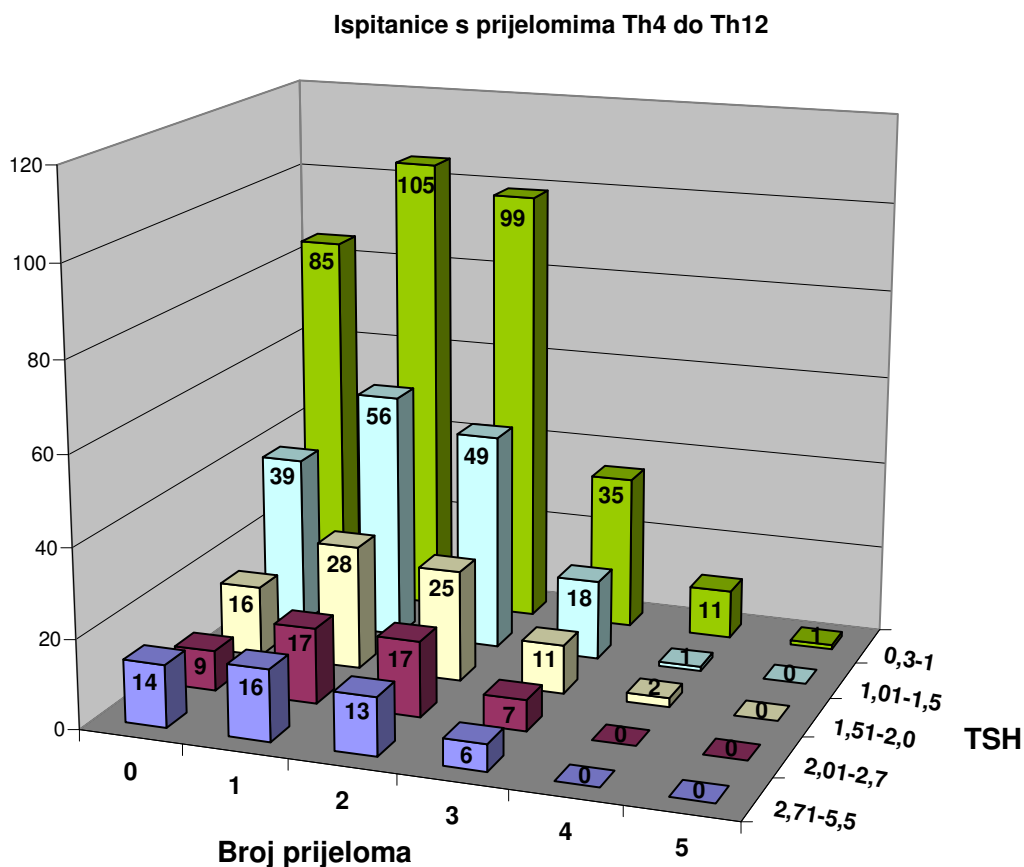
<b>Broj prijeloma kralježaka (Th4 do L5)</b>							
<b>TSH (mIU/L)</b>	<b>0 N=99 (14,6%)</b>	<b>1 N=167 (24,6%)</b>	<b>2 N=225 (33,1%)</b>	<b>3 N=124 (18,2%)</b>	<b>4 N=47 (6,9%)</b>	<b>5 N=18 (2,6%)</b>	<b>Ukupno N=680 (100%)</b>
<b>0.3-1.0</b>	7.94%	11.62%	15.88%	8.68%	3.53%	1.76%	336 (49.41%)
<b>1.01-1.5</b>	3.09%	6.91%	8.24%	3.97%	1.62%	0.15%	163 (23.97%)
<b>1.51-2.0</b>	1.47%	2.35%	4.56%	2.06%	1.18%	0.44%	82 (12.06%)
<b>2.01-2.7</b>	0.74%	2.06%	2.35%	1.62%	0.44%	0.15%	50 (7.35%)

	<b>Broj prijeloma kralježaka (Th4 do L5)</b>						
<b>TSH</b> (mIU/L)	<b>0</b> N=99 (14,6%)	<b>1</b> N=167 (24,6%)	<b>2</b> N=225 (33,1%)	<b>3</b> N=124 (18,2%)	<b>4</b> N=47 (6,9%)	<b>5</b> N=18 (2,6%)	<b>Ukupno</b> N=680 (100%)
<b>2.71-5.5</b>	1.32%	1.62%	2.06%	1.91%	0.15%	0.15%	49 (7.21%)

Iz slike 5.3.2. vidljivo je da od 680 žena s osteoporozom 163 (24%) nije imalo osteoporotični prijelom grudnog kralježka, a ostalih 517 (76%) imalo je 1, 2, 3, 4 ili 5 i više kompresivnih prijeloma grudnih kralježaka. U skupini s najnižom vrijednosti TSH (0,3-1,0 mIU/L) bilo je ukupno 251 prijelom grudnog kralježka (48,5%). Ako su ubroje prijelomi u ispitanica čiji je TSH bio nisko normalan (0,3-2,0 mIU/L), tada smo imali 441 ispitanicu s prijelomom bar jednog grudnog kralježka.(85,3%), što je visoka učestalost. U navedenoj skupini najviše je bilo ispitanica (189) koje su imale 1 prijelom (36,6%), zatim 173 s dva prijeloma (33,5%) i 64 s 3 prijeloma (12,4%). Ispitanica s četiri prijeloma u skupini nisko normalnih vrijednosti TSH bilo je 14 (2,7%) od ukupno 517 prijeloma.

Slika 5.3.2. Prikazuje pojavnost i učestalost radiološki očitanih prijeloma grudnih kralježaka (Th4 do Th12) u apsolutnim vrijednostima (slika A) i postocima (tablica B) u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti.

A



B

Broj prijeloma grudnih kralježaka (Th4 do Th12)							
TSH (mIU/L)	0 N=163 (24%)	1 N=222 (32,6%)	2 N=203 (29,8%)	3 N=77 (11,3%)	4 N=14 (2,1%)	5 N=1 (0,1%)	Ukupno N=680 (100%)
<b>0.3-1.0</b>	12.50%	15.44%	14.56%	5.15%	1.62%	0.15%	336 (49.41%)
<b>1.01-1.5</b>	5.74%	8.24%	7.21%	2.65%	0.15%	0%	163 (23.97%)
<b>1.51-2.0</b>	2.35%	4.12%	3.68%	1.62%	0.29%	0%	82 (12.06%)

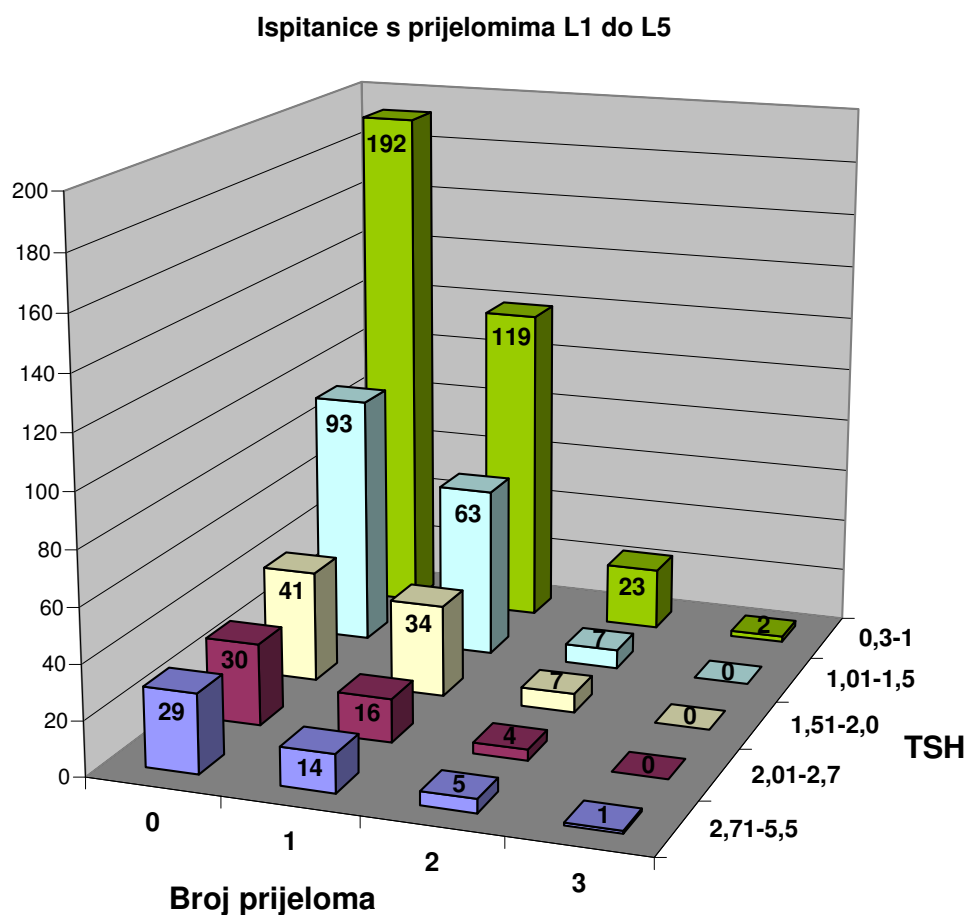
	<b>Broj prijeloma grudnih kralježaka (Th4 do Th12)</b>						
<b>TSH (mIU/L)</b>	<b>0 N=163 (24%)</b>	<b>1 N=222 (32,6%)</b>	<b>2 N=203 (29,8%)</b>	<b>3 N=77 (11,3%)</b>	<b>4 N=14 (2,1%)</b>	<b>5 N=1 (0,1%)</b>	<b>Ukupno N=680 (100%)</b>
<b>2.01-2.7</b>	1.32%	2.50%	2.50%	1.03%	0%	0%	50 (7.35%)
<b>2.71-5.5</b>	2.06%	2.35%	1.91%	0.88%	0%	0%	49 (7.21%)

Iz slike 5.3.3. vidljivo je da od ukupno 680 žena s osteoporozom 385 (56,6%) nije imalo osteoporotični prijelom slabinskog kralježka, a ostalih 295 (43,4%) imalo je 1, 2 ili 3 kompresivna prijeloma slabinskih kralježaka. U skupini s najnižom vrijednosti TSH (0,3-1,0 mIU/L) bilo je ukupno 144 žena s prijelomom slabinskog kralježka (48,8%). Ako su ubroje prijelomi u ispitanica čiji je TSH bio nisko normalan (0,3-2,0 mIU/L), imali smo 255 ispitanica s prijelomom bar jednog slabinskog kralježka (86,4%) što je veoma visoka učestalost. U navedenoj skupini bilo je 216 ispitanica koje su imale 1 prijelom (73,2%), te 37 s dva prijeloma (12,5%) i 2 ispitanice s 3 prijeloma slabinskih kralježaka (0,7%).



Slika 5.3.3. Prikazuje pojavnost i učestalost radiološki očitanih prijeloma slabinskih kralježaka (L1 do L5) u apsolutnim vrijednostima (slika A) i postocima (tablica B) u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti.

A



B

TSH (mIU/L)	Broj prijeloma slabinskih kralježaka (L1 do L5)				Ukupno N=680 (100%)
	0 N=385 (56,6%)	1 N=246 (36,2%)	2 N=46 (6,8%)	3 N=3 (0,4%)	
<b>0.3-1.0</b>	28.24%	17.50%	3.38%	0.29%	336 (49.41%)
<b>1.01-1.5</b>	13.68%	9.26%	1.03%	0%	163 (23.97%)
<b>1.51-2.0</b>	6.03%	5.00%	1.03%	0%	82 (12.06%)

	<b>Broj prijeloma slabinskih kralježaka (L1 do L5)</b>				
<b>TSH (mIU/L)</b>	<b>0 N=385 (56,6%)</b>	<b>1 N=246 (36,2%)</b>	<b>2 N=46 (6,8%)</b>	<b>3 N=3 (0,4%)</b>	<b>Ukupno N=680 (100%)</b>
<b>2.01-2.7</b>	4.41%	2.35%	0.59%	0%	50 (7.35%)
<b>2.71-5.5</b>	4.26%	2.06%	0.74%	0.15%	49 (7.21%)

Raščlamba prijeloma kralježaka u području grudne i slabinske kralježnice pokazala je slične rezultate raspodjele prijeloma kao i analiza svih prijeloma zajedno. Analiza regresije svih prijeloma pokazala je da postoji granična značajnost za broj prijeloma u žena s osteoporozom i niskim vrijednostima TSH. Te su razlike izraženije u području grudne, nego slabinske kralježnice (Slike 5.3.2. i 5.3.3.). Raščlambom frekvencije prijeloma u odnosu na vrijednosti TSH uočeno je da postoji povećana vjerojatnost od novog prijeloma kralježka u žena s vrijednostima TSH manjim od 1 mU/L (Tablica 5.3.1.). Isti zaključak odnosi se na frekvenciju prijeloma grudne i slabinske kralježnice (Tablice 5.3.2 i 5.3.3.).

Regresijskom raščlambom povezanost vrijednosti TSH s učestalosti prijeloma kralježaka u grudnom, slabinskom i ukupno svih prijeloma obje regije nismo našli statistički značajnu razliku (Tablica 5.3.4.). Objašnjenje navedenih rezultata je u tome što se radi o visoko selekcioniranoj populaciji, u kojoj je nađena visoka učestalost prijeloma u žena s nisko normalnim vrijednostima TSH, a ekstrapolacija rezultata nije moguća. Stoga, možemo reći da u populaciji pacijentica s osteoporozom i u onih sa znatno smanjenom mineralnom gustoćom kosti TSH nije prediktor veće učestalosti prijeloma.

Tablica 5.3.4. Rezultati regresijske analize za sve prijelome

<b>Prijelomi</b>	<b>F</b>	<b>Df<sub>1,2</sub></b>	<b>P</b>
<b>Grudna kralježnica</b>	0,27	1,683	0,6006
<b>Slabinska kralježnica</b>	1,15	1,683	0,2846

<b>Zajedno</b>	1,31	1,683	0,2530
----------------	------	-------	--------

Kako za ukupne, tako i za grupirane prijelome u području grudne i slabinske kralježnice razlika nije statistički značajna kako u učestalosti, tako ni u broju prijeloma prema grupiranim TSH vrijednostima. Znači da povezanost pojavnosti i učestalosti broja prijeloma u žena s osteoporozom nije više ovisna o TSH vrijednostima u serumu iako se najveći dio ispitanica s osteoporotičnim prijelomom (49,41%) nalazi u nisko normalnim vrijednostima TSH, tj. prvoj kvazikvintili (0,3 do 1,0 mIU/L).

Prema raščlambi unakrsnih tablica greška je značajno manja, no i dalje statistički nije značajna. Ukupno za prijelome kralježaka iznosi  $\chi^2=8,09$ ;  $df=12$ ;  $P = 0,77$ ; a za prijelome grudne kralježnice iznosi  $\chi^2=4,62$ ;  $df=12$ ;  $P = 0,969$ , te za prijelome slabinske kralježnice:  $\chi^2=12,76$ ;  $df=12$ ;  $P = 0,387$ .

Zaključujemo da TSH u skupini pacijentica s već dokazanom osteoporozom nije prediktor nastanka prvog, kao niti bilo kojeg slijedećeg prijeloma kralježka. TSH je prediktor samo u ukupnoj postmenopauzalnoj populaciji žena. Međutim sve osteoporotične žene imaju jednak rizik za prijelom bez obzira na vrijednost TSH. Znači da kada smo izgubili kost TSH više nije čimbenik za predviđanje, ali se može postati osteoporotičan i sa visokom vrijednosti TSH.

#### **5.4. Učinak djelovanja endogenog TSH na hormone štitnjače i biljege koštane pregradnje u postmenopauzalnih žena**

##### **5.4.1. Učinak postepenog porasta suprimiranih vrijednosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje nakon prekida tireosupresivnog HNL levotiroksinom u pacijentica s odstranjenom štitnom žlijezdom zbog karcinoma štitnjače (protokol C1)**

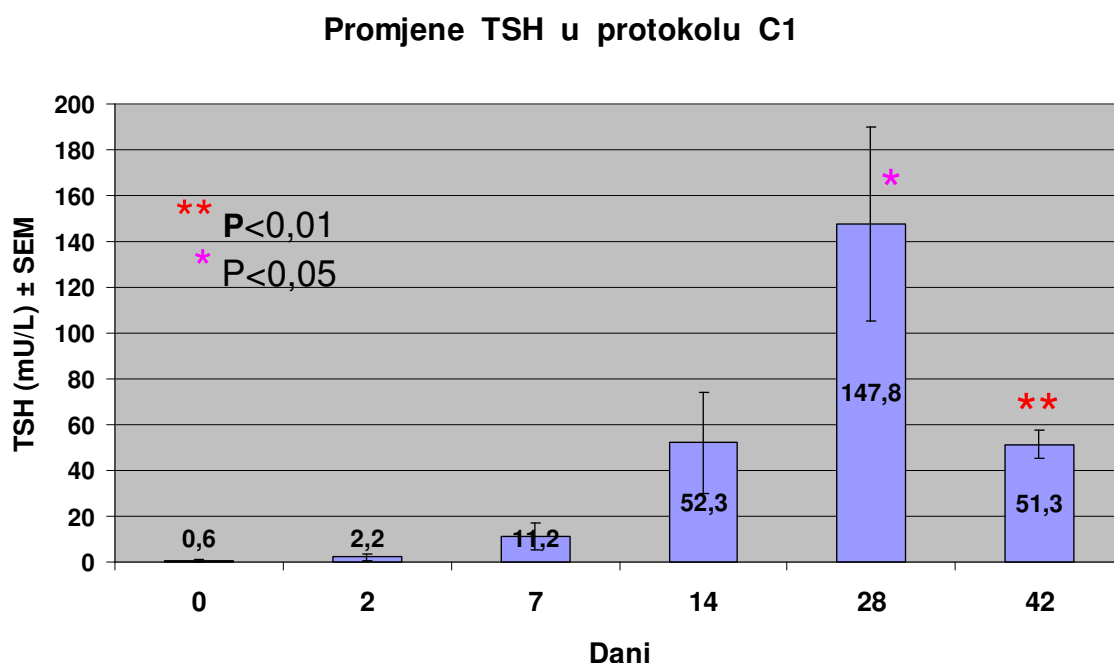
Protokol C1 ima za cilj istražiti mogući učinak izrazitog porasta suprimiranih vrijednosti endogenog TSH na koštanu pregradnju u postmenopauzalnih žena kojima je štitna žlijezda odstranjena zbog karcinoma štitnjače i koje su trajno na tireosupresivnom HNL-u levotiroksinom (LT4), što održava serumske vrijednosti TSH ispod klinički normalnih vrijednosti tj. stanju subkliničke hipertireoze. Prekidom uzimanja LT4 na 28 dana omogućili smo porast endogenog TSH, a svrha ispitivanja bila je mjerenjem promjena vrijednosti endogenog TSH, biljega koštane pregradnje i drugih metaboličkih parametara u serumu tijekom slijedećih 6 tjedana utvrditi da li se pojačana koštana pregradnja suprimiranim TSH može smanjiti ili blokirati izrazitim porastom endogenog TSH. Nedostatak ovih protokola je nemogućnost apsolutnog isključenja utjecaja peroralno primjenjenih hormona štitnjače u svrhu tireosupresivne terapije !

U protokol C1 uključili smo 6 žena s totalnom tireoidektomijom prosječne životne dobi  $49,7 \pm 4,33$  godine ( $X \pm SEM$ ). Jedina ispitanica u premenopauzi imala je 29 godina, a ostalih 5 (83%) su žene postmenopauzalne dobi između 51 i 59 godina, koje su prema anamnestičkim podacima i dostupnoj medicinskoj dokumentaciji zadovoljavale uključujuće i isključujuće kriterije za studiju. Bolesnice se redovito kontroliraju u Zavoda za nuklearnu medicinu Kliničke bolnice «Sestre Milosrdnice» u Zagrebu. Prosječna vrijednost kalcija u serumu (Ca/s) na početku ispitivanja iznosila je  $2,28 \pm 0,08$  mmol/L s najmanjom vrijednosti 2,01 mmol/L u jedne ispitanice i 2,09 mmol/L u druge ispitanice, a u ostale četiri ispitanice vrijednosti kalcija bile su u granicama normale. Prosječna vrijednost anorganskog fosfora u serumu (P/s) na početku ispitivanja iznosila je  $1,22 \pm 0,05$  mmol/L i u svih ispitanica vrijednosti su bile u granicama normale.

Tijekom 28 dana neuzimanja hormonske tireosupresivne terapije LT4 u žena nakon totalne tireoidektomije, djelovanjem negativne povratne hormonske kontrole došlo je do izrazitog porasta serumskih TSH vrijednosti od nemjerljivo niskih do iznad 70 mU/L (porast

od 93 do 8.000 puta) što nam je omogućilo istraživanje učinka rastućeg endogenog TSH na biljege koštane pregradnje i druge metaboličke parametre koji bi mogli utjecati ili biti posljedica promjena (slika 4.2.). Prosječna vrijednost serumskog TSH u protokolu C1 prije prekida tireosupresivne terapije tj. 0. dan iznosila je  $0,62 \pm 0,41$  mU/L, i slijedećih tjedan dana postepeno je rasla do vrijednosti  $11,2 \pm 5,91$  mU/L što je povećanje 18,7 puta, iako nije bilo statistički signifikantno ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.1.1.). Negativnom povratnom spregom manjak hormona štitnjače povećava serumsku vrijednost endogenog TSH 14. dan na  $52,3 \pm 22,08$  mU/L što je 87 puta u odnosu na početnu vrijednost. Zadnji dan prekida tireosupresivne terapije tj. 28. dan postiže se prosječni porast vrijednosti endogenog TSH za gotovo 250 puta, odnosno iznosi  $147,8 \pm 42,36$  mU/L ( $P < 0,05$ ). Tada se ponovno uvodi HNL pomoću LT4 i prosječna serumska vrijednost endogenog TSH u slijedećih 14 dana, odnosno 42. dan od početka testa pada na  $51,3 \pm 6,07$  mU/L što je 87 puta veće od početne vrijednosti ( $P < 0,001$ ). Iako je porast vrijednosti endogenog TSH u serumu izrazito velik statistički značajno povećanje endogenog TSH nalazimo tek 28. dan ( $P < 0,05$ ), a 42. dan testa je statistički još značajnije ( $P < 0,001$ ). Najmanji porast vrijednosti endogenog TSH u serumu iznosio je 93 puta, a najveći 8.000 puta u odnosu na početnu vrijednost.

Slika 5.4.1.1. Prikazuje promjenu vrijednosti endogenog TSH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).



Prosječna početna vrijednost biljega koštane razgradnje u serumu, C-telopeptid prokolagena tipa 1 (CTXs ili  $\beta$  crosslaps) nakon prekida tireosupresivne terapije značajno je veća nego u protokolu C2 i iznosi  $0,305 \pm 0,07$   $\mu\text{g/L}$ , kao posljedica suprimiranih TSH vrijednosti što ostaje i 2. dan testa tj. iznosi  $0,324 \pm 0,08$   $\mu\text{g/L}$ , dok 7. dan pokazuje tendenciju smanjenja i iznosi  $0,287 \pm 0,08$   $\mu\text{g/L}$  tj. 6% manje od prosječnih početnih vrijednosti. Iako promjena nije statistički značajna korelira sa značajnim porastom endogenog TSH. Kako se povećava vrijednost endogenog TSH tako dolazi do smanjenja CTXs i to 14. dan na vrijednost  $0,257 \pm 0,08$   $\mu\text{g/L}$  odnosno 15,7%, 28. dan na prosječnu vrijednost CTXs od  $0,21 \pm 0,08$   $\mu\text{g/L}$  odnosno 31,2% i u 42. danu na  $0,199 \pm 0,06$   $\mu\text{g/L}$  odnosno smanjenje za 34,8% u odnosu na početnu prosječnu vrijednost (Slika 5.4.1.2.). U prva 2 dana izrazito niskog TSH nema smanjenja CTXs, a potom izrazitim porastom TSH dolazi do postepene supresije koštane razgradnje (CTXs) koja iako iznosi gotovo 50% u 42. danu nije statistički značajna ( $P > 0,05$ ). Akceleracija inhibicije koštane razgradnje nastavlja se i nakon uvođenja u terapiju LT4 (28. dan) i smanjenja TSH (42. dan) što moguće govori o sporosti regulatornih receptorskih mehanizama na osteoblastima i osteoklastima. Usprkos smanjenju CTXs u svih ispitanica, promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ), čak i kod supresije od 34,8% (vj. zbog malog broja ispitanica, jer je standardna pogreška u svih gotovo ista 0,08).

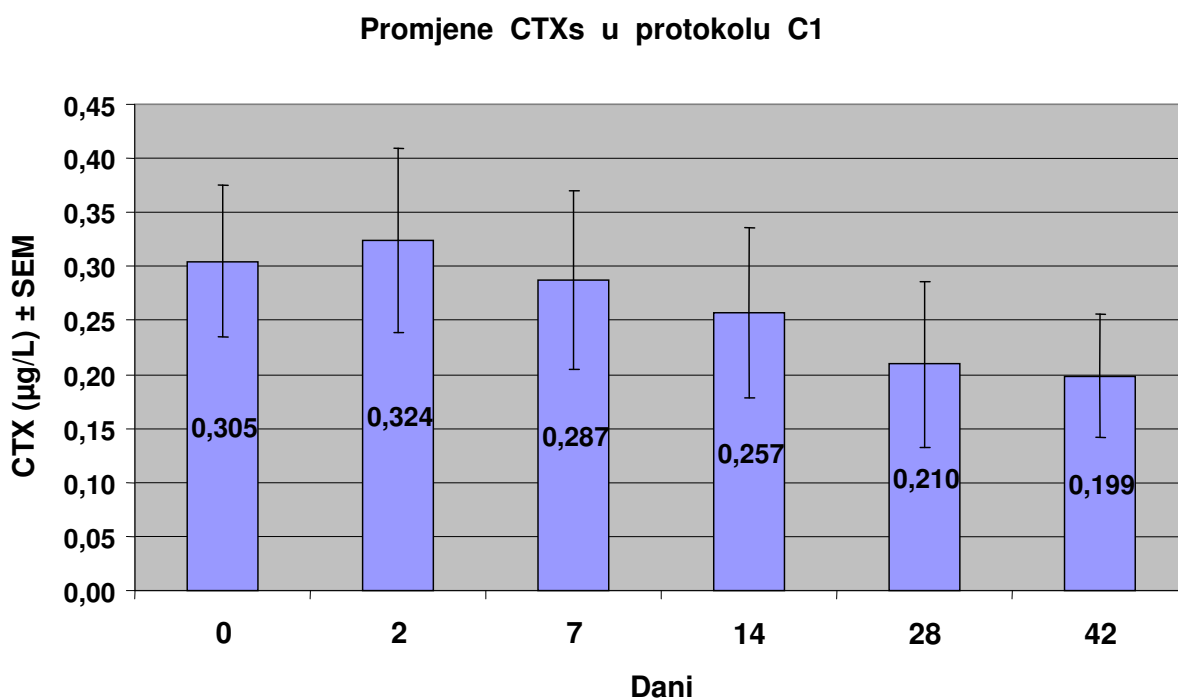
Analiza biljega koštane razgradnje u serumu (CTXs) pokazuje 2,75 puta veće početne prosječne vrijednosti kod suprimiranog endogenog TSH ( $0,305 \pm 0,07$   $\mu\text{g/L}$  u protokolu C1) nego kada je endogeni TSH visok ( $0,111 \pm 0,04$   $\mu\text{g/L}$  u protokolu C2), što potvrđuje naše rezultate da su niski i nisko normalni TSH rizični čimbenik za osteoporozu, odnosno da je tireosupresivna terapija povezana s većom pojavom osteoporoze u tih žena.

Početne vrijednosti CTXs se značajno razlikuju među ispitanicama, odnosno u 3 ispitanice (50%) su značajno niže i iznose  $0,161 \pm 0,02$   $\mu\text{g/L}$ , nego u ostale 3 ispitanice  $0,448 \pm 0,06$   $\mu\text{g/L}$ . Činjenica je da u svih 6 žena tijekom izrazitog porasta endogenog TSH nalazimo smanjenje CTXs od 16 do 90%. Međutim zanimljivo da su ispitanice s početno visokim CTXs imale prosječno značajno manju supresiju koštane razgradnje ( $(27,3+17+16)/3 = 20,1\%$ ), nego one ispitanice s početno niskim vrijednostima CTXs ( $(73+90+54)/3 = 72,3\%$ ).

Prema rezultatima ovog istraživanja mogli bi zaključiti da suprimirani endogeni TSH dovodi do jače koštane pregradnje, a da je učinak supresije visokim endogenim TSH značajniji što su početne vrijednosti CTX niže. Odnosno višestruki porast endogenog TSH

djeluje kao negativni regulator koštane pregradnje, a njegovo sniženje dovodi do povećanja koštane pregradnje.

Slika 5.4.1.2. Prikazuje promjenu vrijednosti CTXs ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).

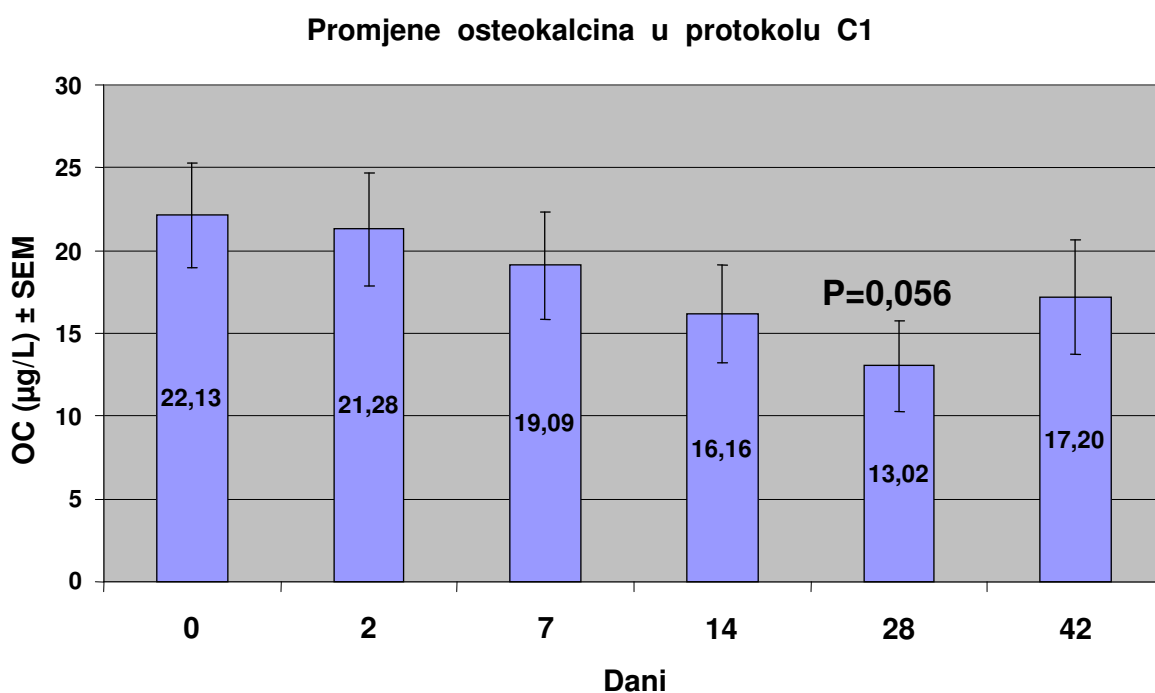


Analiza biljega koštane izgradnje u serumu, osteokalcina (OC), pokazuje značajno veće prosječne početne vrijednosti ( $22,13 \pm 3,19 \mu\text{g/L}$ ) kod suprimiranog endogenog TSH (protokol C1), nego kod visokih vrijednosti TSH u protokolu C2 ( $9,28 \pm 1,26 \mu\text{g/L}$ ), a razlika iznosi 2,39 puta vj. kao posljedica suprimiranih TSH vrijednosti, slično kao i CTXs. Prema tome 2. dan iznosi  $21,28 \pm 3,41 \mu\text{g/L}$ , u 7. danu je  $19,09 \pm 3,22 \mu\text{g/L}$  i 14. dan postaje još niže te iznosi  $16,16 \pm 2,97 \mu\text{g/L}$  tj. 27% manje od prosječnih početnih vrijednosti ( $P > 0,05$ ). U vrijeme najvećeg porasta endogenog TSH (28. dan), serumski OC se smanjuje na najnižu vrijednost i iznosi  $13,02 \pm 2,75 \mu\text{g/L}$  odnosno za 41% ( $p = 0,056$ ), a u 42. danu smanjenjem endogenog TSH ponovo raste i iznosi  $17,2 \pm 3,43 \mu\text{g/L}$  odnosno za 22% ( $P > 0,05$ ) manje od prosječnih početnih vrijednosti (Slika 5.4.1.3.). Iako je supresija OC u postocima slična smanjenju CTXs, ovdje nalazimo statistički graničnu supresiju 28. dan testa u odnosu na početne vrijednosti

( $P=0,056$ ). U ovom slučaju značajan porast suprimiranog endogenog TSH dovodi do supresije normalnih vrijednosti biljega koštane izgradnje (OC) ispod donjih granica normale.

Čini se da je razgradnja kosti potisnuta više od koštane izgradnje na temelju rezultata određivanja koštanih biljega u serumu tijekom ovog ispitivanja. Time smo potvrdili istraživanja Abe i suradnika koji su na temelju izbačenog gena za TSH-R zaključili da endogeni TSH djeluje kao negativni regulator koštane pregradnje potiskujući aktivnost osteoklasta i osteoblasta.

Slika 5.4.1.3. Prikazuje promjenu vrijednosti serumskog osteokalcina ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).

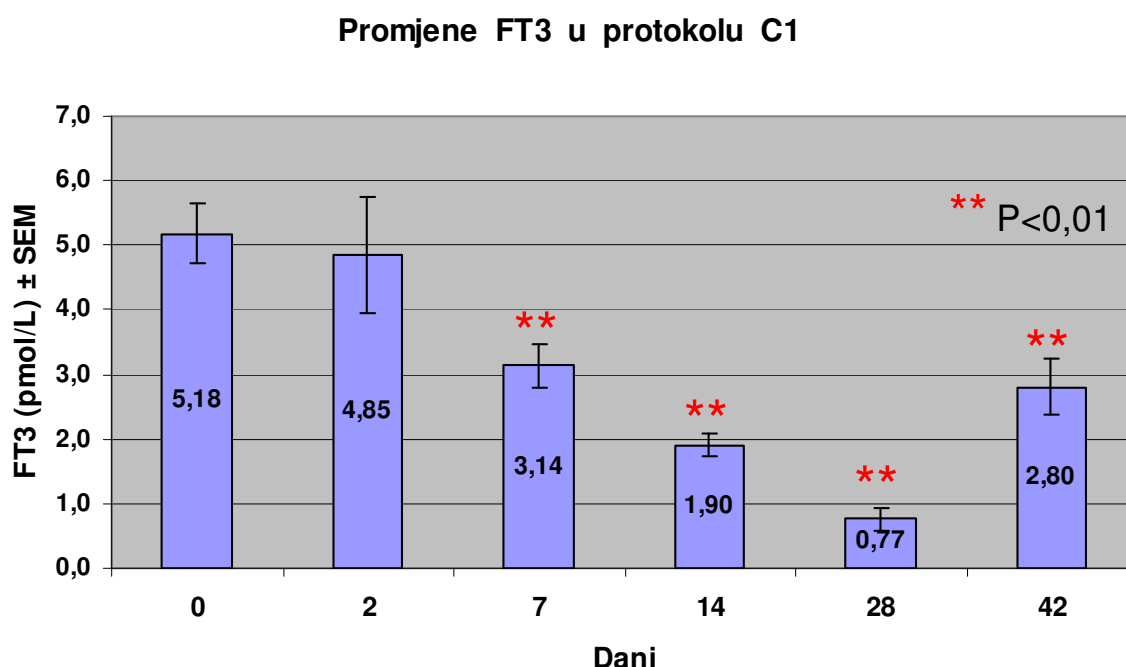


Nakon totalne tireoidektomije i radiojodne terapije zbog liječenja karcinoma štitnjače bolesnice su na trajnoj tireosupresivnoj terapiji s levotiroksinom što ima za cilj održavanje vrijednosti endogenog TSH ispod donjih granica normale (supresija). Nakon prekida tireosupresivne terapije tijekom 28 dana, zbog potrebe kontrolne scintigrafije, serumske vrijednosti slobodnih hormona štitnjače vrlo se brzo smanjuju uzrokujući porast endogenog TSH. Analiza slobodnog, biološki aktivnog, trijodtironina u serumu (FT3) pokazuje statistički



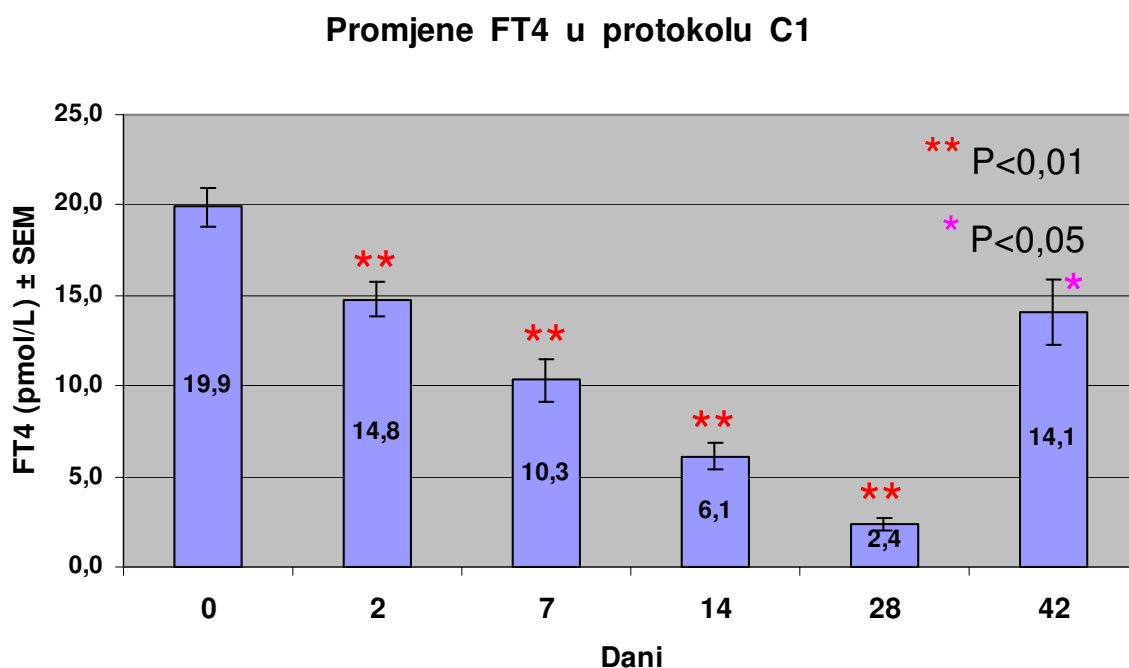
značajno smanjenje 7. dan od prekida uzimanja LT4 na usta (p.o.) i prosječna vrijednost iznosi  $3,14 \pm 0,34$  pmol/L (smanjenje za 30,4%;  $P < 0,01$ ), s tendencijom daljnjeg smanjenja do izrazito niskih vrijednosti 14. dan ( $1,9 \pm 0,18$  pmol/L) i 28. dan ( $0,77 \pm 0,18$  pmol/L) tj. do ispod granica detektibilnosti u dvije ispitanice (FT3  $< 0,428$  pmol/L). Ponovnim uzimanjem LT4 nakon 14 dana (42. dan testa) raste serumska vrijednost FT3 ( $2,8 \pm 0,43$  pmol/L;  $P < 0,001$ ) no još se ne postižu očekivane vrijednosti normale niti u jedne ispitanice (slika 5.4.1.4.).

Slika 5.4.1.4. Prikazuje promjenu vrijednosti FT3 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (\*\* $P < 0,01$ ).



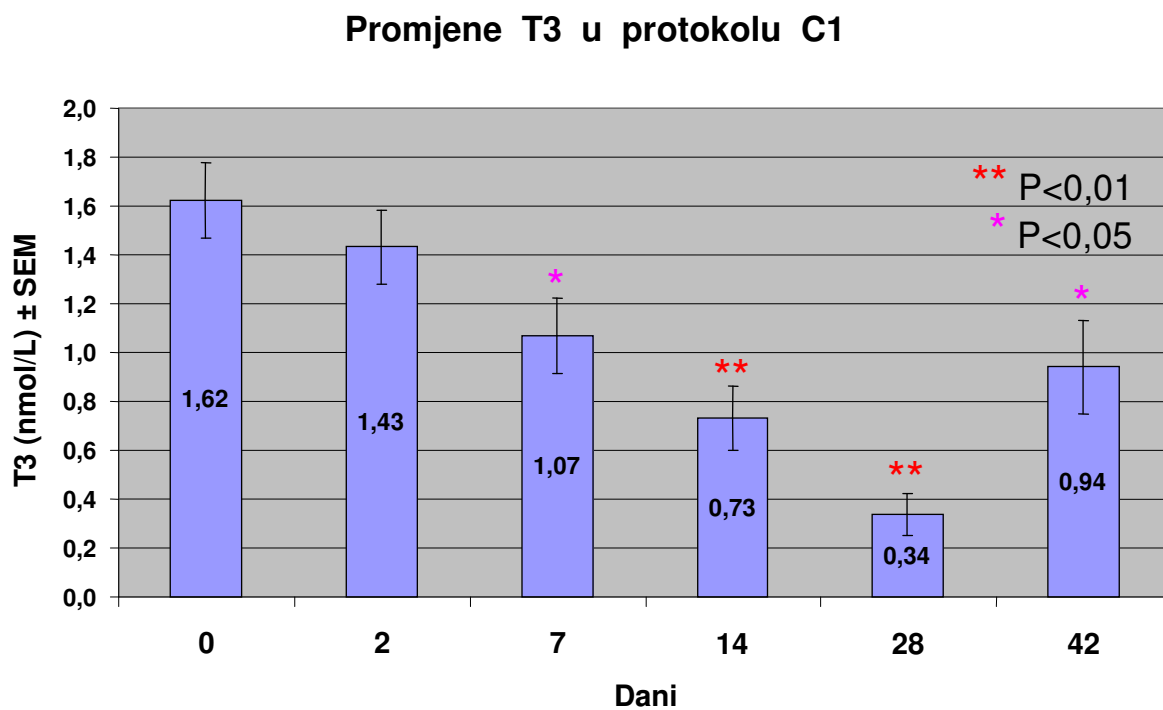
Analiza slobodnog, biološki aktivnog, tiroksina u serumu (FT4) pokazuje statistički značajno smanjenje već 2. dan prekida uzimanja levotiroksina s prosječnom vrijednosti  $14,8 \pm 0,95$  pmol/L (smanjenje za 25,6%;  $P < 0,01$ ) i tendencijom smanjenja u slijedećim kontrolama ispod donjih granica normale 7. dan ( $10,3 \pm 1,21$  pmol/L; za 48,2%), 14. dan ( $6,13 \pm 0,7$  pmol/L) i 28. dan ( $2,4 \pm 0,35$  pmol/L) ( $P < 0,01$ ). Ponovnim uzimanjem levotiroksina nakon 14 dana (42. dan testa) značajno raste serumska vrijednost FT4 ( $14,1 \pm 1,83$  pmol/L;  $P < 0,05$ ) kada se postižu očekivane vrijednosti normale (slika 5.4.1.5.).

Slika 5.4.1.5. Prikazuje promjenu vrijednosti FT4 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

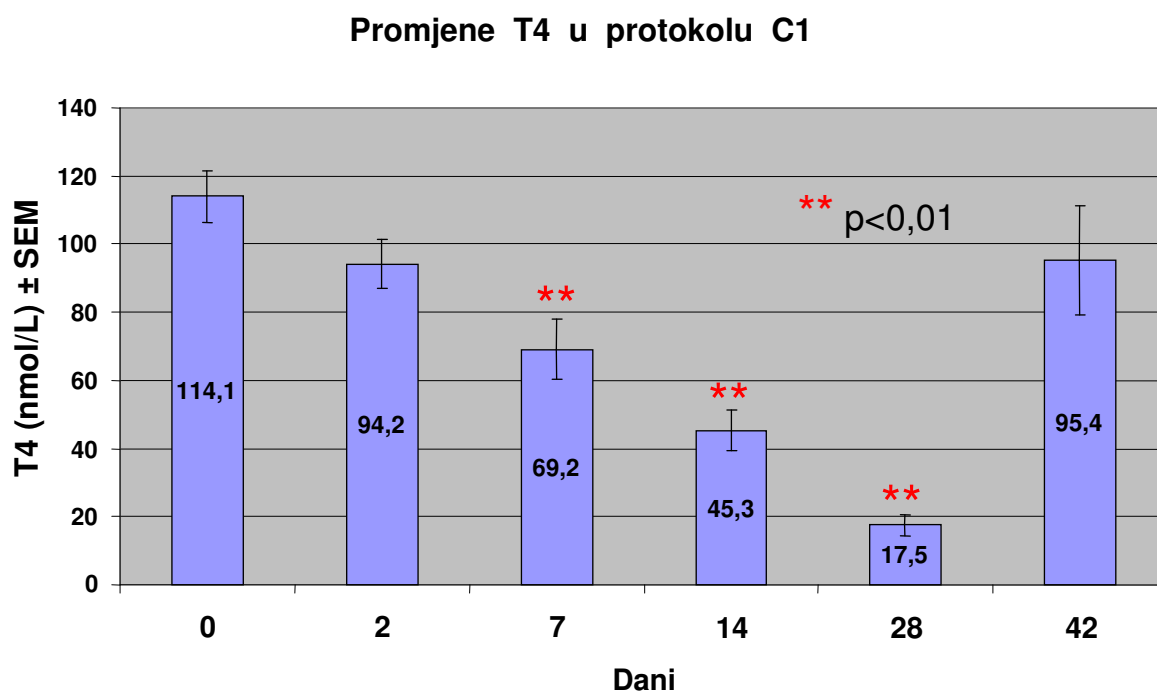


Slobodni hormoni štitnjače klinički su pouzdaniji jer nisu ovisni o proteinskim nosačima, a analizu ukupnih hormona štitnjače napravili smo samo u 4 ispitanice kako bi usporedili smanjenje slobodne i ukupne frakcije hormona štitnjače u serumu. Slično kao slobodne frakcije hormona štitnjače, tako su se vrijednosti ukupnog trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) u serumu smanjivale nakon prestanka uzimanja LT4 s postizanjem najnižih vrijednosti 28. dan izostanka supstitucije, što je u dvije ispitanice za T3 bilo ispod granice detektibilnosti metode ( $< 0,291$ ). Mogli bi reći samo da je smanjenje ukupnih vrijednosti hormona štitnjače bilo nešto „sporije“ u odnosu na njihove slobodne frakcije što je logično obzirom na mehanizam vezanja. Statistički značajno smanjenje vrijednosti T3 u serumu postignuto je 7. dan s prosječnom vrijednosti  $1,07 \pm 0,15$  nmol/L (34%;  $P < 0,05$ ) (slika 5.4.1.6.) i za T4 također 7. dan s prosječnom vrijednosti  $69,17 \pm 8,67$  nmol/L (39,4%;  $P < 0,01$ ) (slika 5.4.1.7.).

Slika 5.4.1.6. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti T3 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).



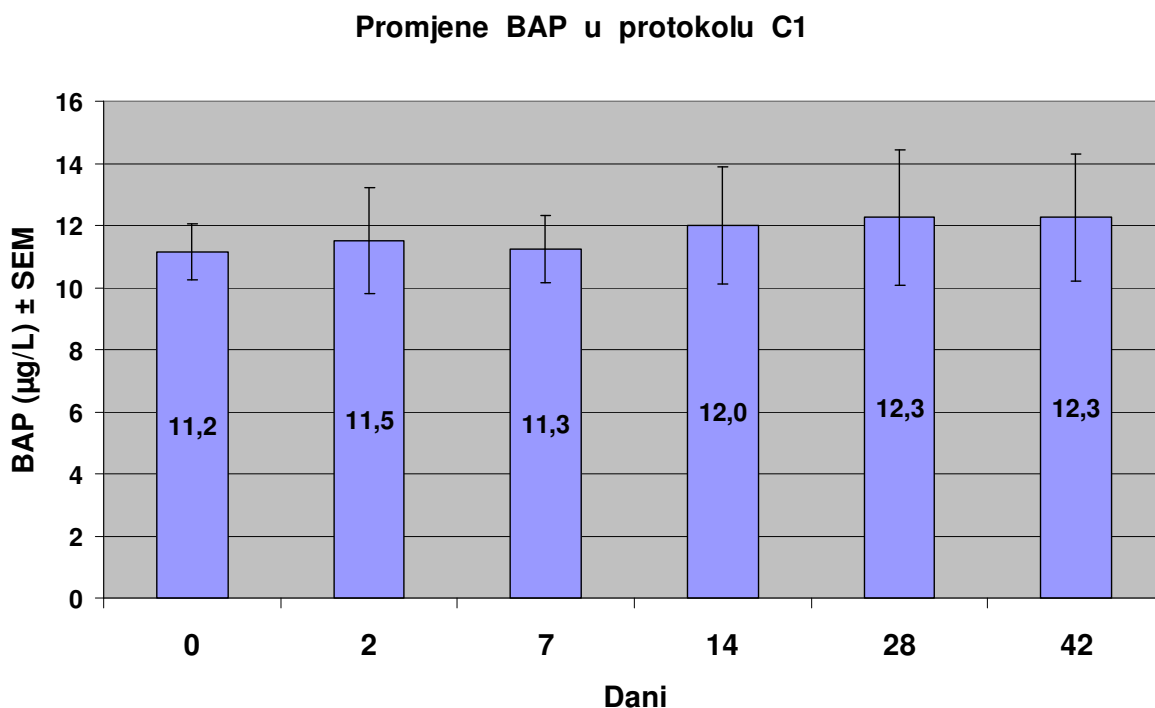
Slika 5.4.1.7. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti T4 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (\*\* $P < 0,01$ ).



Vrijednosti ukupnog T4 u serumu nakon prestanka tireosupresivnog liječenja pale su u rasponu do 28. dana za približno 6,5 puta, međutim, 28. dan još su uvijek bile mjerljive. Vrijednosti ukupnog serumskog T3 također su padale u vremenu za približno 4,8 puta, da bi 28. dana bile nemjerljivo niske u dvije ispitanice. Sličan trend zabilježen je i mjerenjem FT3 i FT4 s time da je FT4 pao za približno 8,3 puta 28. dan prestanka LT4., a FT3 za približno 6,7 puta, odnosno u dvije ispitanice ispod granice mjerljivosti. Iz ovoga zaključujemo da veliki porast endogenog TSH ima neposredan učinak na kost i u odsustvu endogenog T3 i T4, a u prisutnosti male rezidualne količine T4 hormona zbog hormonskog nadomjesnog liječenja uzrokuje potiskivanje i usporavanje koštane pregradnje.

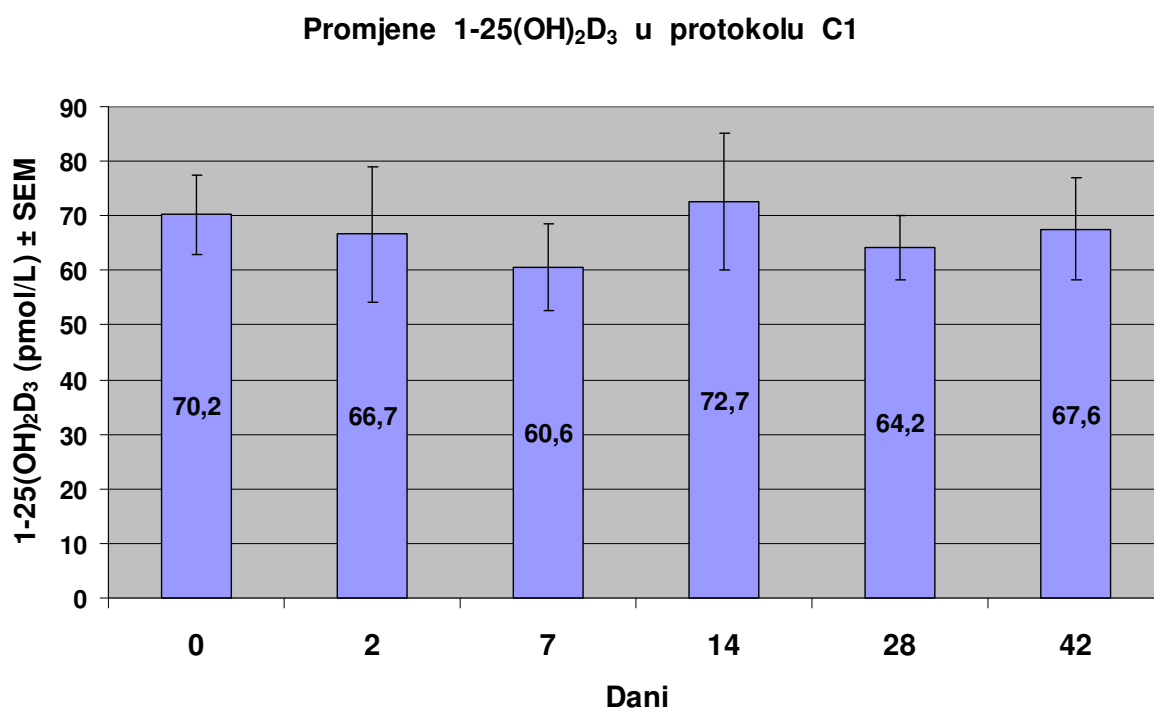
Prosječne serumske vrijednosti koštane alkalne fosfataze (BAP), biljega koštane izgradnje, tijekom porasta suprimiranog TSH nisu se značajnije mijenjale. Manji porast se nalazi 28. i 42. dan testa, prosječno  $12,3 \pm 2,18$   $\mu\text{g/L}$  u odnosu na početne vrijednosti u 0. danu (prosječno  $11,17 \pm 0,9$   $\mu\text{g/L}$ ) odnosno porast svega 9,7%, što nije statistički značajno ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.1.8).

Slika 5.4.1.8. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti BAP-a ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



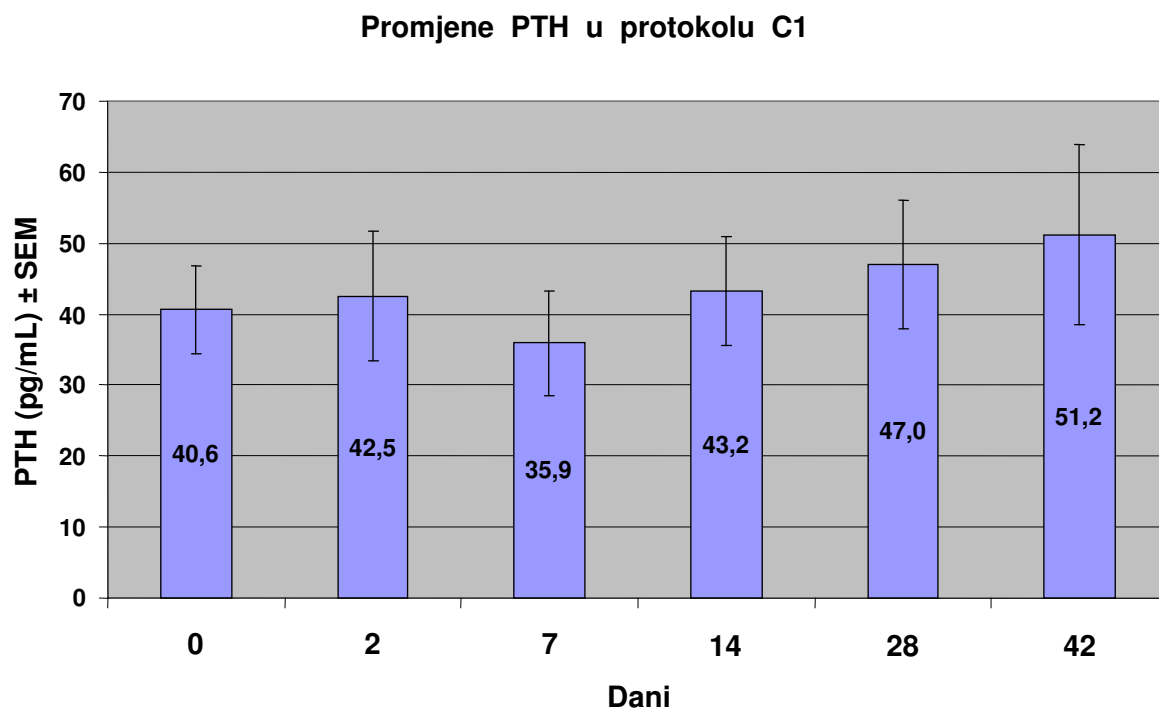
Vjerojatnost da promjena TSH utječe na serumske vrijednosti vitamina D ili parathormona u protokolu C1, koji bi mogli utjecati na koštanu pregradnju, isključili smo analiziranjem navedenih parametara nakon prekida tireosupresivnog liječenja i naglog porasta suprimiranog endogenog TSH. Prosječna početna vrijednost 1-25 dihidroksi vitamina D<sub>3</sub> (1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) iznosila je  $70,2 \pm 7,26$  pmol/L s maksimalnim porastom od 3,6% u 14. danu tj.  $72,7 \pm 12,5$  pmol/L i sniženjem od 13,7% u 7. danu tj.  $60,6 \pm 7,87$  pmol/L u odnosu na početnu vrijednost (Slika 5.4.1.9.). Sve promjene 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ).

Slika 5.4.1.9. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (X±SEM) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije (P>0,05).



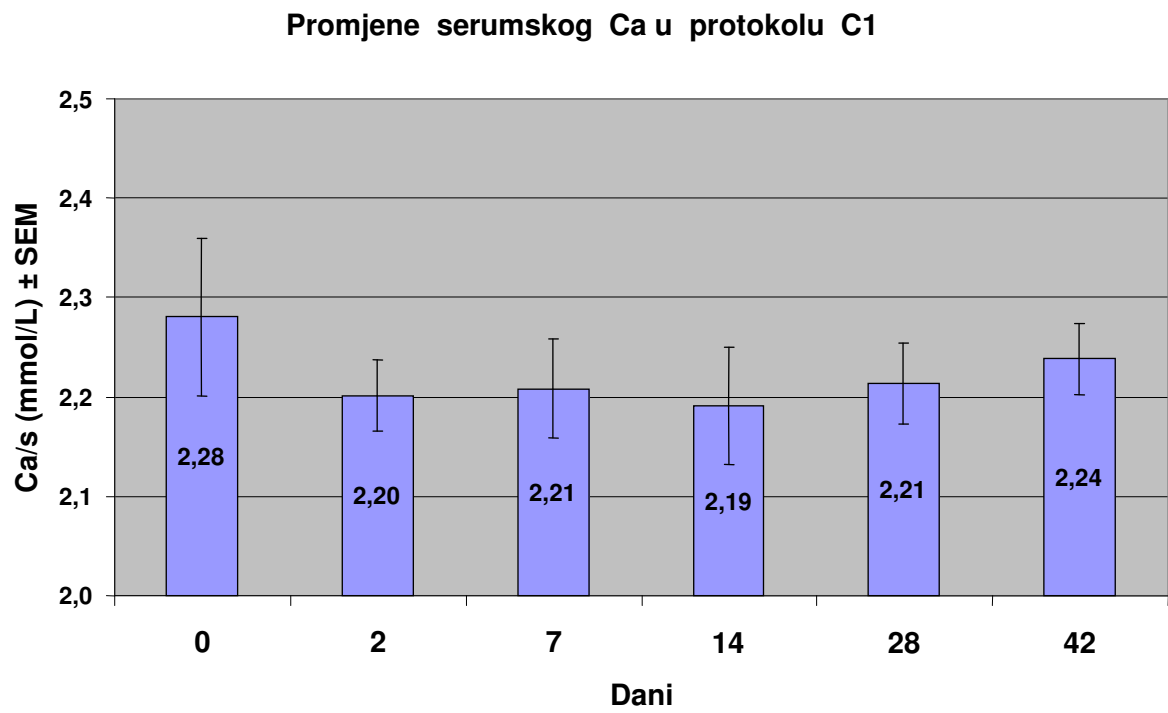
Slično tako ni promjene serumskog parathormona (PTH) nisu bile značajne da bi mogle utjecati na koštanu pregradnju. Prosječna početna vrijednost PTH iznosila je 40,6±6,11 pg/mL s maksimalnim porastom za 15,8% u 28. danu tj. 47,0±9,01 pg/mL i 26,1% u 42. danu tj. 51,2±12,67 pg/mL, a smanjenjem za 11,6% u 7. danu tj. 35,9±7,42 pg/mL u odnosu na početnu vrijednost (Slika 5.4.1.10.). Sve promjene PTH u protokolu C1 u odnosu na početne vrijednosti nisu bile statistički značajne (P>0,05).

Slika 5.4.1.10. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti PTH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



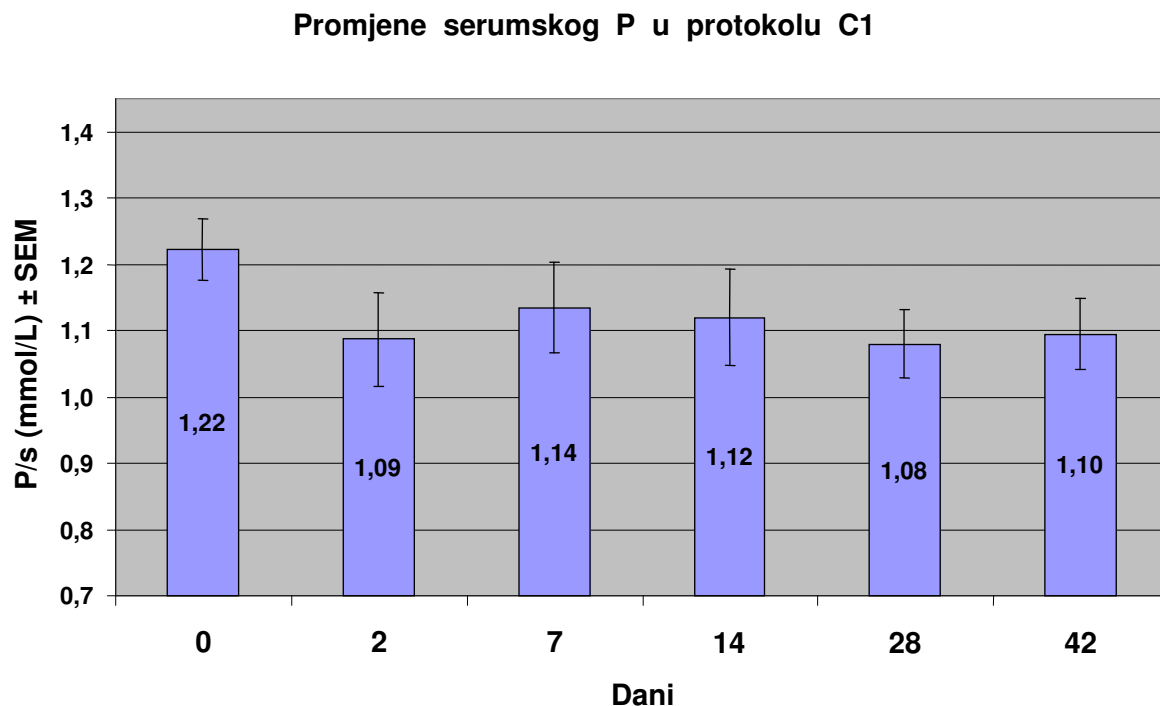
Mogućnost da nagli porast suprimiranog endogenog TSH djeluje na Ca/s i P/s, koje bi mogle utjecati na koštanu pregradnju, isključili smo kontrolom navedenih parametara nakon prestanka tireosupresivne terapije. Prosječne serumske vrijednosti Ca u protokolu C1 bile se relativno niske s postepenim smanjenjem od početnih  $2,28 \pm 0,08$  mmol/L do  $2,19 \pm 0,06$  pmol/L u 14. danu testa što je niže za 4% i nije statistički značajno ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.1.11.). Prosječne serumske vrijednosti P također nisu značajnije oscilirale ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.1.12).

Slika 5.4.1.11. Prikazuje promjenu vrijednosti Ca/s ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).





Slika 5.4.1.12. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti P ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C1 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon 28 dana prekida tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



#### 5.4.2. Učinak postepenog smanjenja visokih vrijednosti endogenog TSH na biljege koštane pregradnje u pacijentica nakon operativnog odstranjenja štitnjače i neuzimanja HNL levotiroksinom tijekom 28 dana (protokol C2)

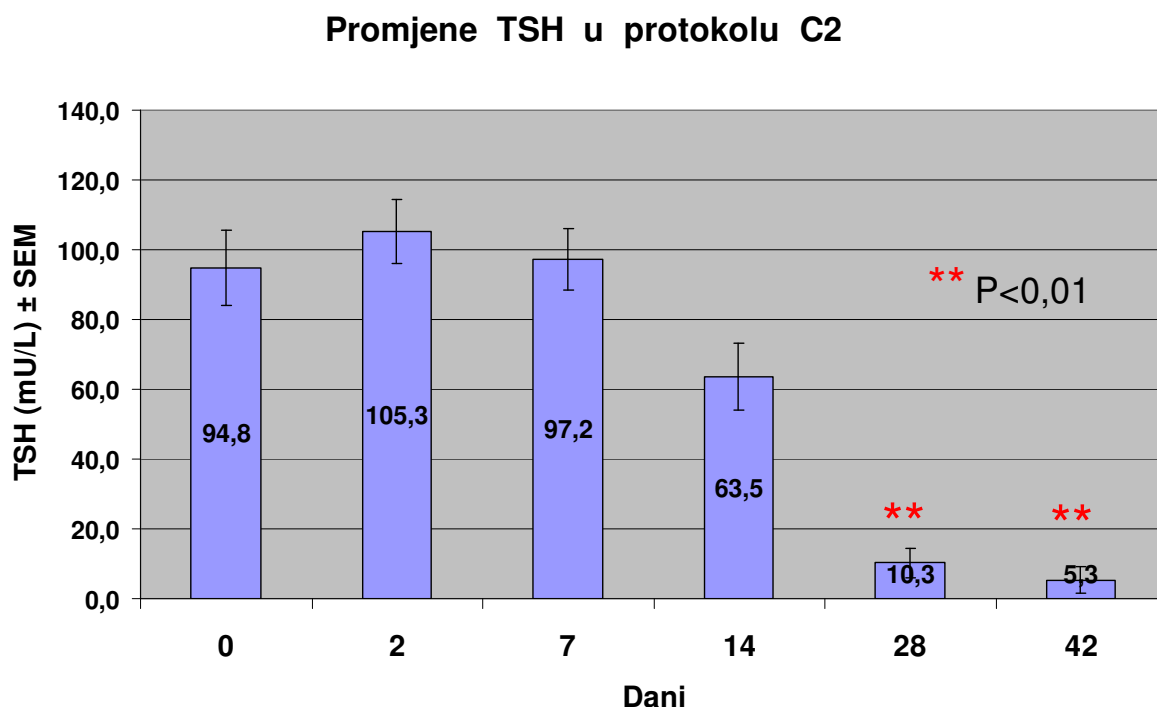
Kako bismo istražili mogući učinak smanjenja visokih vrijednosti endogenog TSH na koštanu pregradnju u žena kojima je štitna žlijezda odstranjena zbog karcinoma štitnjače i nakon 28 dana neuzimanja HNL-a levotiroksinom, mjerili smo vrijednosti TSH, biljege koštane pregradnje i druge metaboličke parametre u serumu tijekom slijedećih 6 tjedana od početka tireosupresivnog HNL-a (Slika 4.3.). Svrha navedenog ispitivanja bila je utvrditi da li je potisnuta koštana pregradnja visokim vrijednostima TSH podložna brzom oporavku nakon smanjenja endogenog lučenja (supresije) TSH.

U navedeni protokol (C2) uključili smo 5 žena s totalnom tireoidektomijom prosječne životne dobi  $47,6 \pm 4,74$  godine ( $X \pm SEM$ ). Najmlađa ispitanica imala je 36, a najstarija 64 godine i sve su prema anamnestičkim podacima i dostupnoj medicinskoj dokumentaciji zadovoljavale uključujuće i isključujuće kriterije za studiju. Bolesnice se redovito kontroliraju

u Zavoda za nuklearnu medicinu Kliničke bolnice «Sestre Milosrdnice» u Zagrebu, a prema dostupnim medicinskim podacima 4 ispitanice (80%) spadaju u grupu postmenopauzalnih žena. Prosječna vrijednost Ca/s na početku ispitivanja iznosila je  $2,18 \pm 0,06$  mmol/L s najmanjom vrijednosti 2,04 mmol/L u jedne ispitanice i 2,07 mmol/L u druge ispitanice, a u ostalih su vrijednosti kalcija bile u granicama normale. Prosječna vrijednost P/s na početku ispitivanja iznosila je  $1,14 \pm 0,04$  mmol/L i u svih ispitanica su vrijednosti bile u granicama normale.

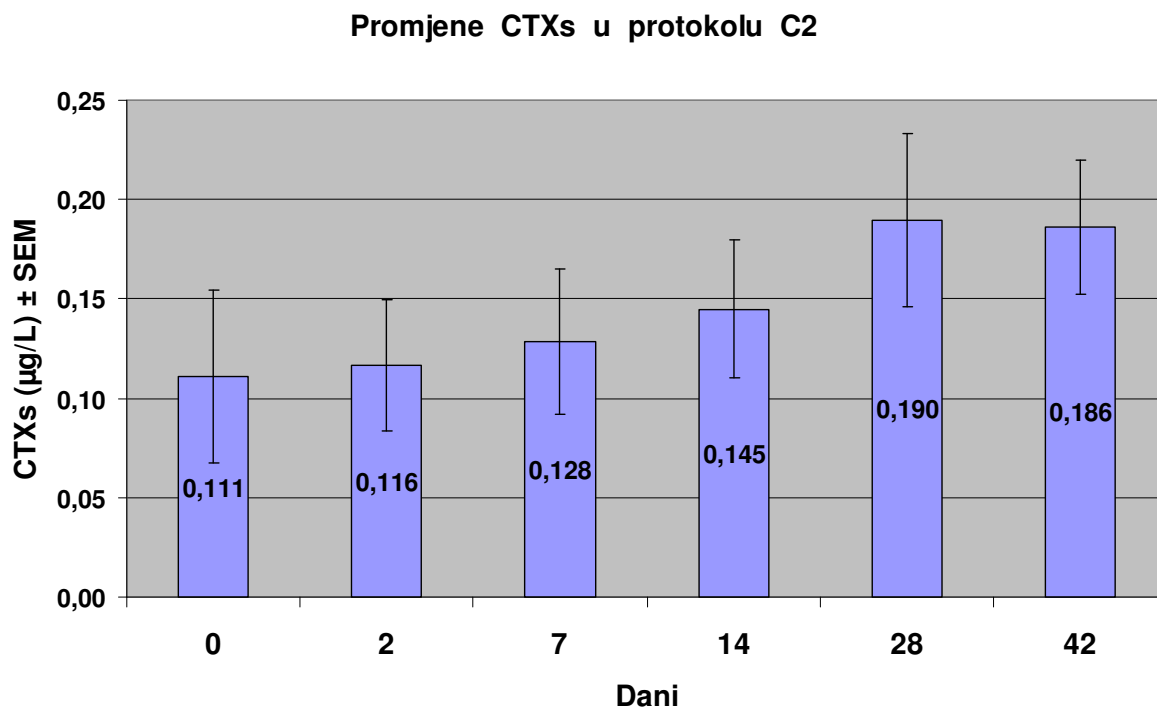
Tijekom 28 dana nedostatka hormona štitnjače, nakon totalne tireoidektomije i neuzimanja hormonske supstitucije levotiroksinom, djelovanjem negativne povratne hormonske kontrole došlo je do izrazitog porasta serumskih TSH vrijednosti od normalnih vrijednosti do iznad 90 mU/L, više od 30 puta (slika 5.4.2.1.). Prosječna vrijednost endogenog serumskog TSH u protokolu C2 prije početka hormonske supstitucije levotiroksinom tj. 0. dan iznosila je  $94,8 \pm 10,81$  mU/L, i slijedećih tjedan dana uz terapiju levotiroksinom još uvijek je bila vrlo visoka tj. 2. dan testa iznosila je  $105,3 \pm 9,16$  mU/L odnosno 7. dan testa je  $97,2 \pm 8,86$  mU/L. Znači da je potrebno izvjesno vrijeme, oko 10-tak dana, za reakciju hipofize na periferne hormone štitnjače. Tek 14. dan od početka uzimanja levotiroksina serumska vrijednost endogenog TSH značajnije pada i prosječno iznosi  $63,5 \pm 9,67$  mU/L ( $P=0,064$ ), što je 33% manje od početne vrijednosti. Značajno sniženje prosječne vrijednosti endogenog TSH nalazimo tek 28. dan kada iznosi  $10,3 \pm 4,29$  mU/L odnosno 42. dan testa  $5,3 \pm 3,8$  mU/L ( $P=0,001$ ) (slika 5.4.2.1.). Tek 42. dan od početka tireosupresivne terapije u protokolu C2 kod tri ispitanice (60%) serumске vrijednosti endogenog TSH manje su od 0,78 mU/L, a druge dvije vrijednosti su 5,24 i 19,99 mU/L. Najmanji pad vrijednosti endogenog TSH u serumu iznosio je 6,45 puta, a najveće smanjenje 653 puta u odnosu na početnu vrijednost.

Slika 5.4.2.1. Vrijednosti endogenog TSH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\*\* $P < 0,01$ ).



Analiza CTXs pokazala je izrazito sniženu početnu vrijednost u svih ispitanica, prosječno  $0,111 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$ , kao posljedicu visokih endogenih serumskih TSH vrijednosti. Naime, 2. dan testa prosječni CTXs iznosi  $0,116 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$ , u 7. danu je  $0,128 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$  i u 14. danu  $0,145 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$  tj. 30,5% iznad prosječnih početnih vrijednosti. U to vrijeme dolazi do značajnog pada serumskih vrijednosti TSH, a CTXs u 28. danu još raste na  $0,19 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$  odnosno 71% i u 42. danu ostaje povišena i iznosi  $0,186 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$  odnosno 67,6% iznad prosječnih početnih vrijednosti (Slika 5.4.2.2.). U prvih 7 dana visokih vrijednosti TSH u serumu nije bilo značajnijeg porasta biljega koštane razgradnje, a potom značajnijim smanjenjem endogenog TSH dolazi do porasta razgradnje kosti za 71% (CTXs) što potvrđuje djelovanje TSH na koštanu pregradnju. Usprkos tako visokom prosječnom porastu, promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ), iako se porast biljega koštane razgradnje nalazi u svih ispitanica, od 8% do 1100%, što je posljedica premalenog broja ispitanica. Prema rezultatima ovog istraživanja mogli bi zaključiti da višestruki porast endogenog TSH djeluje kao negativni regulator koštane pregradnje, a njegovo sniženje dovodi do povećanja koštane pregradnje.

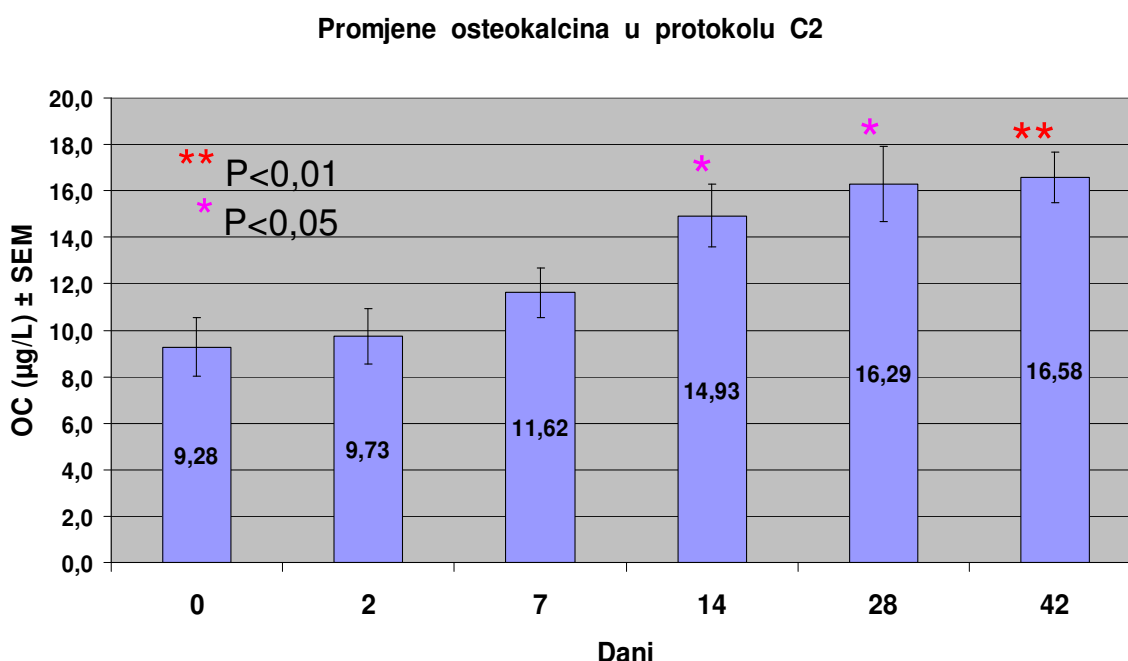
Slika 5.4.2.2. Prikazuje promjenu vrijednosti CTXs ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



Analiza OC u serumu pokazuje izrazito sniženu početnu vrijednost u svih ispitanica, prosječno  $9,28 \pm 1,26 \mu\text{g/L}$  vj. kao posljedicu visokih TSH vrijednosti, slično kao i CTXs. Prema tome 2. dan također je snižena i iznosi  $9,73 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$ , a počinje rasti 7. dan kada iznosi  $11,62 \pm 1,07 \mu\text{g/L}$  i 14. dan postaje značajno veća te iznosi  $14,93 \pm 1,35 \mu\text{g/L}$  tj. porast 60,9% u odnosu na prosječne početne vrijednosti ( $P < 0,05$ ). U to vrijeme dolazi do značajnog smanjenja visokih serumskih vrijednosti TSH što oslobađa koštanu pregradnju, a serumski OC u 28. danu još raste na  $16,29 \pm 1,6 \mu\text{g/L}$  odnosno 75,5% ( $P = 0,01$ ) i u 42. danu ostaje  $16,58 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$  odnosno 78,7% ( $P < 0,01$ ) iznad prosječnih početnih vrijednosti (Slika 5.4.2.3.). Iako je porast OC u postocima sličan porastu CTXs, ovdje nalazimo statistički značajan porast od 14. dana testa u odnosu na početne vrijednosti. U ovom slučaju postepeno smanjenje visokog endogenog TSH u serumu dovodi do porasta suprimirane izgradnje kosti. To je u suprotnosti s našim pretkliničkim studijama u kojima smo dokazali da jednokratna dnevna primjena malih doza egzogenog TSH bitno potiče stvaranje kosti, a suprimira

aktivnost osteoklasta. Slično tome u kliničkoj praksi dugotrajno povećanje endogenog paratireoidnog hormona dovodi do brze razgradnje kosti zbog povećanog učinka na koštanu razgradnju u odnosu na povećano stvaranje kosti što u konačnici uzrokuje brzi gubitak koštane mase. Slično kao i u TSH jednokratna, ciklička primjena PTH uzrokuje značajno povećanje koštane mase zbog pozitivnog učinka na osteoblaste i smanjenog poticanja osteoklasta.

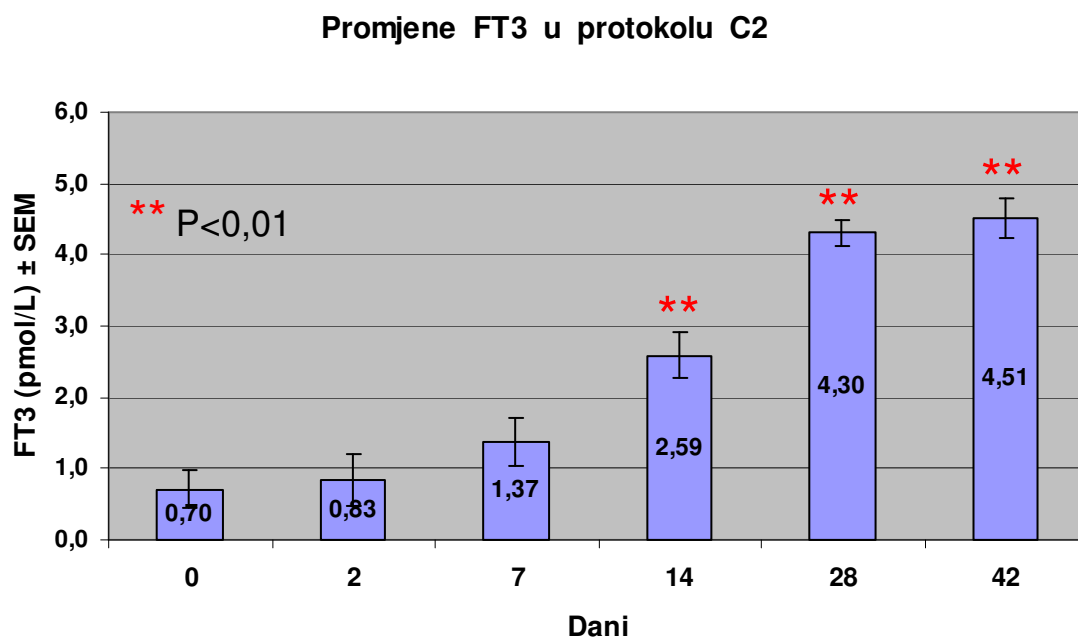
Slika 5.4.2.3. Prikazuje promjenu vrijednosti serumskog osteokalcina ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).



Kako je u ispitanica učinjena totalna tireoidektomija sa svrhom liječenja karcinoma štitnjače, nakon čega su tijekom 28 dana bile bez hormonske supstitucije levotiroksinom zbog potrebe kontrolne scintigrafije, serumske vrijednosti slobodnih hormona štitnjače snizile su se do nemjerljivo niskih vrijednosti za test, a TSH je izrazito porastao. Na početku ispitivanja (0. i 2. dan) analiza slobodnog, biološki aktivnog, FT3 bila je nemjerljivo niska za metodu mjerenja ( $< 0,392$  pmol/L) u tri tj. 60% ispitanica iz skupine. Statistički značajan porast serumske vrijednosti FT3 nalazimo tek 14. dan od početka primjene levotiroksina p.o. kada prosječna vrijednost iznosi  $2,59 \pm 0,33$  pmol/L ( $P < 0,01$ ), s tendencijom vraćanja u granice

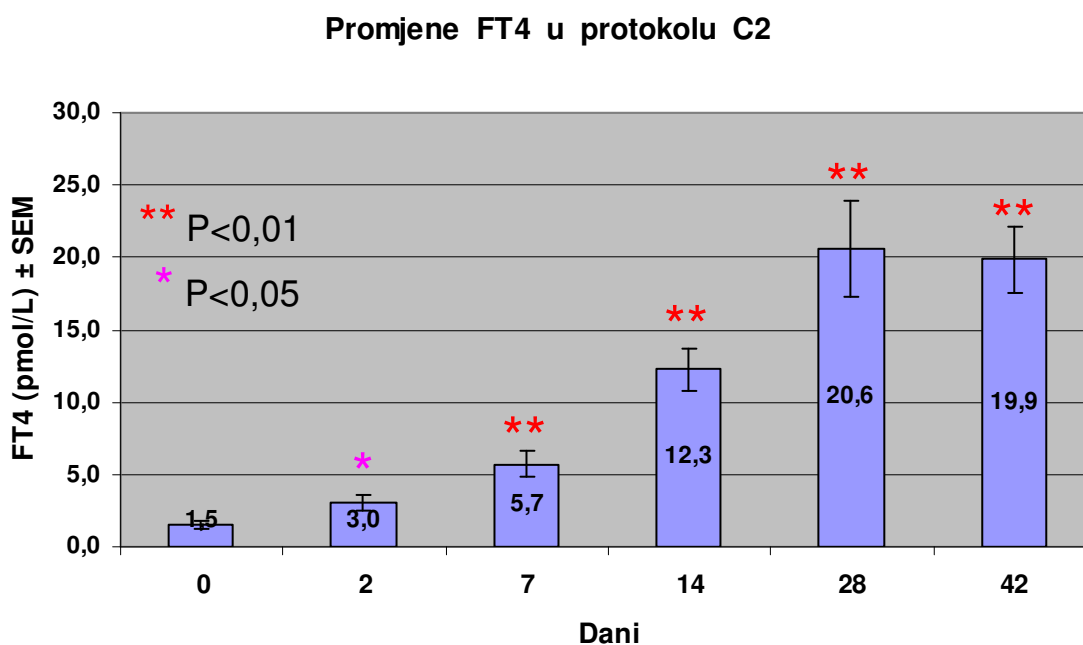
normalnih kliničkih vrijednosti koje se postižu 28. i 42. dan, a iznose  $4,3 \pm 0,18$  pmol/L odnosno  $4,51 \pm 0,28$  pmol/L ( $P < 0,001$ ) (slika 5.4.2.4.).

Slika 5.4.2.4. Prikazuje promjenu vrijednosti FT3 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\*\* $P < 0,01$ ).



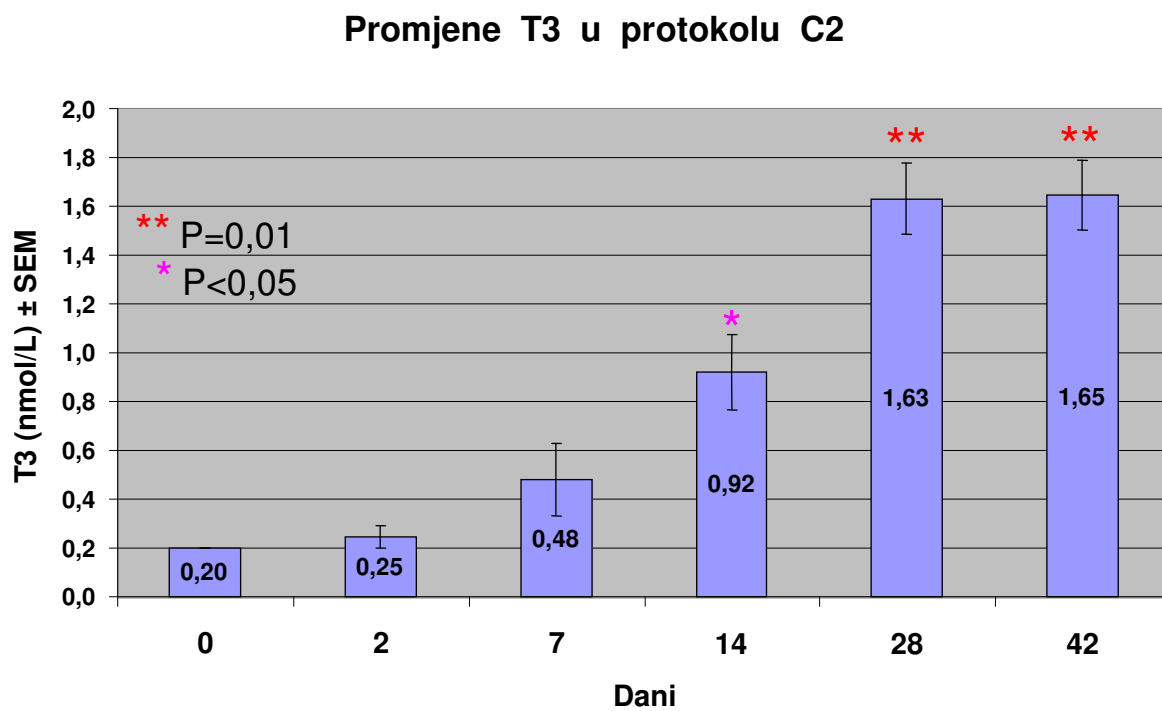
Analiza slobodnog, biološki aktivnog, FT4 pokazuje statistički značajan porast već 2. dan nakon primjene levotiroksina s prosječnom vrijednosti  $3,03 \pm 0,52$  pmol/L ( $P < 0,05$ ) i tendencijom izrazitog porasta u slijedećim kontrolama, a postizanjem normalnih kliničkih vrijednosti već 14. dan od početka HNL-a levotiroksinom ( $P < 0,01$ ) (slika 5.4.2.5.).

Slika 5.4.2.5. Prikazuje promjenu vrijednosti FT4 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).



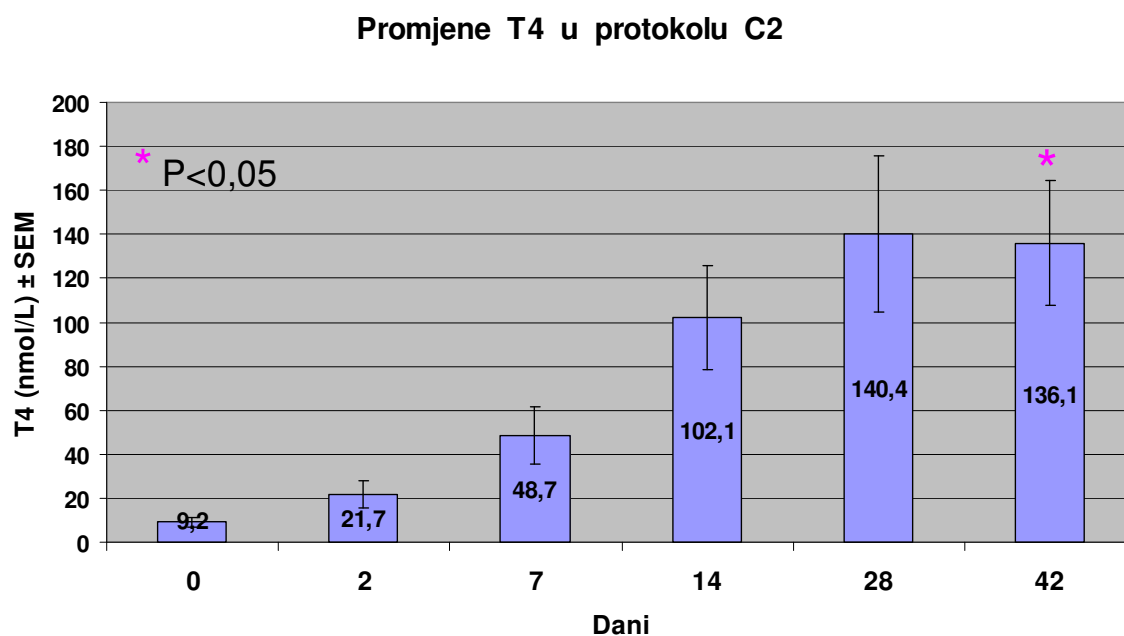
Slobodni hormoni štitnjače klinički su pouzdaniji jer nisu vezani za proteinske nosače, stoga smo analizu ukupnih hormona štitnjače napravili samo u 3 ispitanice kako bi usporedili porast slobodne i vezane (ukupne) frakcije hormona štitnjače u serumu. Slično kao slobodne frakcije hormona štitnjače, tako su vrijednosti ukupnog T3 i T4 u serumu postupno rasle nakon primjene levotiroksina da bi tek 14. odnosno 42. dan bile statistički značajno više u odnosu na početne vrijednosti ( $P < 0,05$ ). Postizanje klinički normalnih vrijednosti u svih ispitanica ostvareno je tek 28. dan za T3 s prosječnom vrijednosti  $1,63 \pm 0,15$  nmol/L (slika 5.4.2.6.) i 14. dan za T4 s prosječnom vrijednosti  $102,1 \pm 23,6$  nmol/L (slika 5.4.2.7.).

Slika 5.4.2.6. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti T3 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P = 0,01$ ).



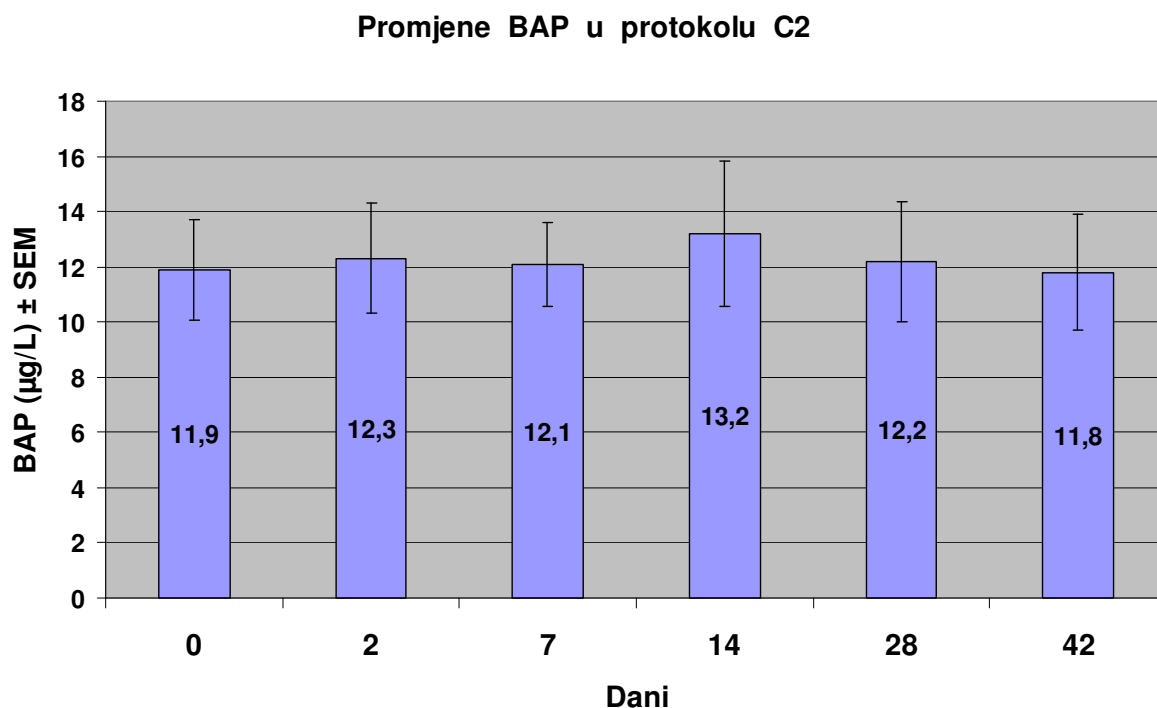


Slika 5.4.2.7. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti T4 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (\* $P < 0,05$ ).



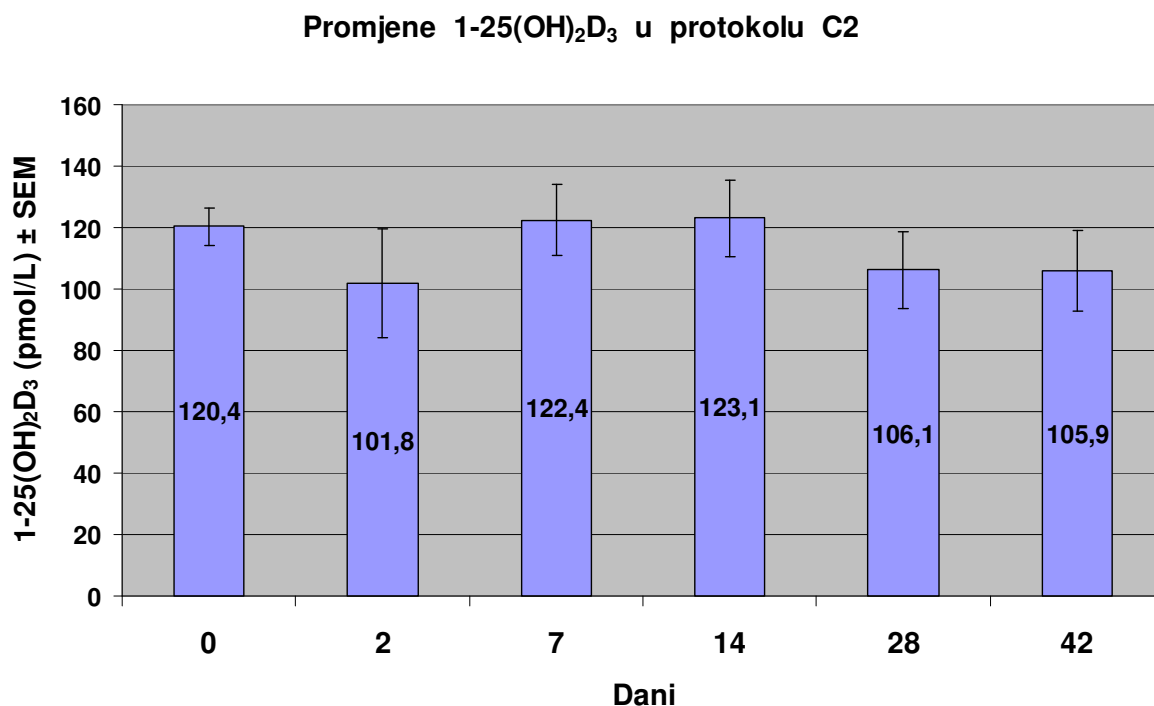
Prosječne serumske vrijednosti BAP-a tijekom smanjenja TSH nisu se značajnije mijenjale. Manji porast se nalazi 14. dan testa, svega 10,9%, tj.  $13,2 \pm 2,65 \mu\text{g/L}$  u odnosu na početne vrijednosti u 0. danu  $11,9 \pm 1,83 \mu\text{g/L}$  ( $P > 0,05$ ). Prije i nakon toga vrijednosti BAP-a u protokolu C2 oscilirale su samo 3,4% (Slika 5.4.2.8.).

Slika 5.4.2.8. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti BAP-a ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



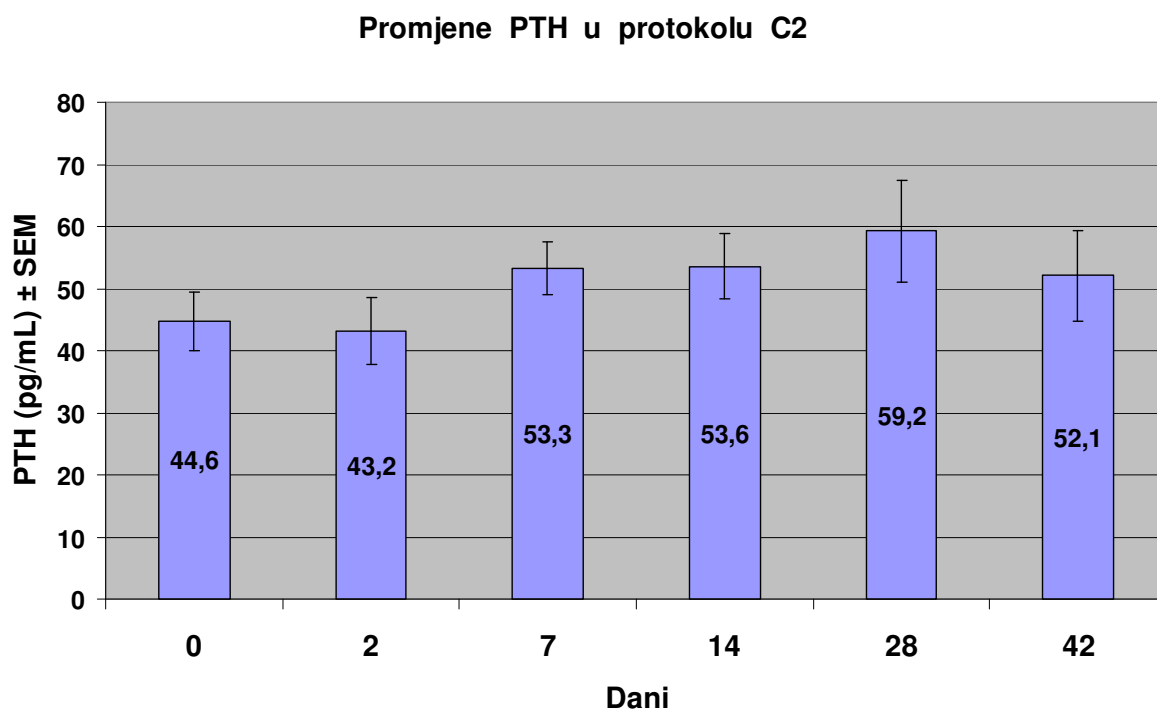
Mogućnost da promjena TSH djeluje na serumske vrijednosti vitamina D ili parathormona koje bi mogle utjecati na koštanu pregradnju isključili smo analiziranjem navedenih parametara tijekom 42 dana od početka hormonske supstitucije levotiroksinom. Prosječna početna vrijednost  $1\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$  iznosila je  $120,38 \pm 6,09$  pmol/L s maksimalnim porastom od 2,2% u 14. danu tj.  $123,1 \pm 12,57$  pmol/L i sniženjem od 15,5% u 2. danu tj.  $101,8 \pm 17,6$  pmol/L u odnosu na početnu vrijednost (Slika 5.4.2.9.). Sve promjene  $1\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ).

Slika 5.4.2.9. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (X±SEM) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije (P>0,05).



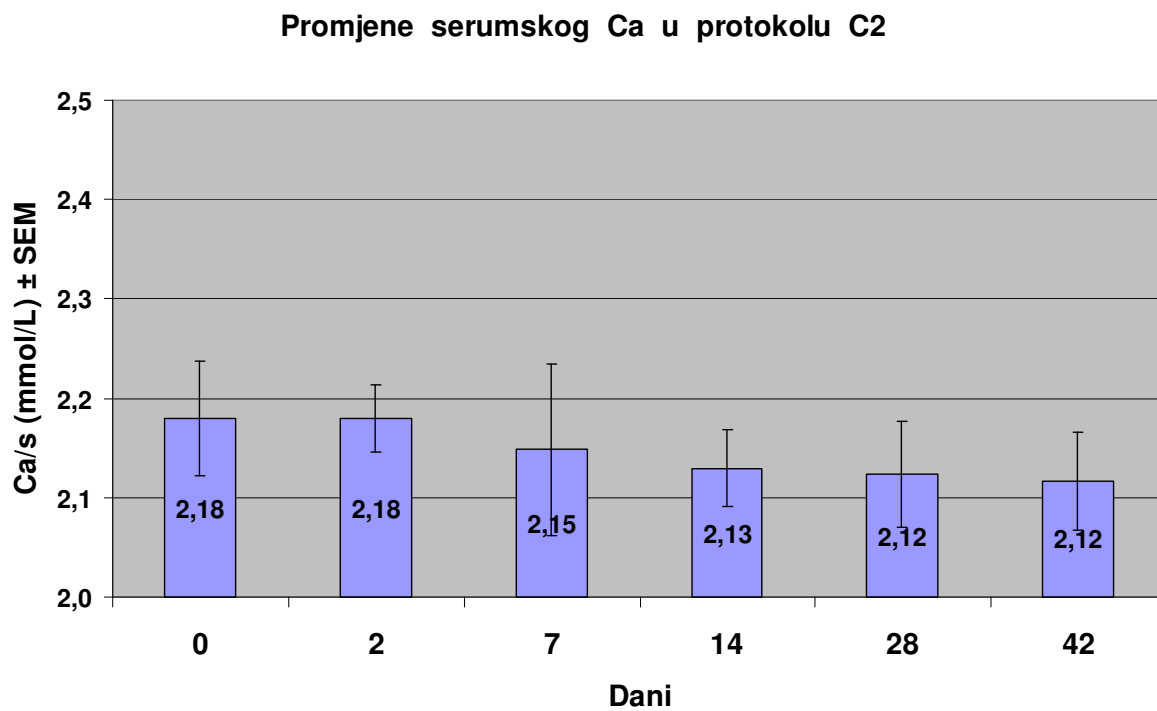
Slično tako ni promjene serumske vrijednosti PTH nisu bile značajne da bi mogle utjecati na koštanu pregradnju. Prosječna početna vrijednost PTH iznosila je 44,6±4,75 pg/mL s maksimalnim porastom za 32,7% u 28. danu tj. 59,2±8,31 pg/mL i smanjenjem od 3,1% u 2. danu tj. 43,2±5,4 pg/mL u odnosu na početnu vrijednost (Slika 5.4.2.10.). Sve promjene PTH nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti (P>0,05).

Slika 5.4.2.10. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti PTH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).

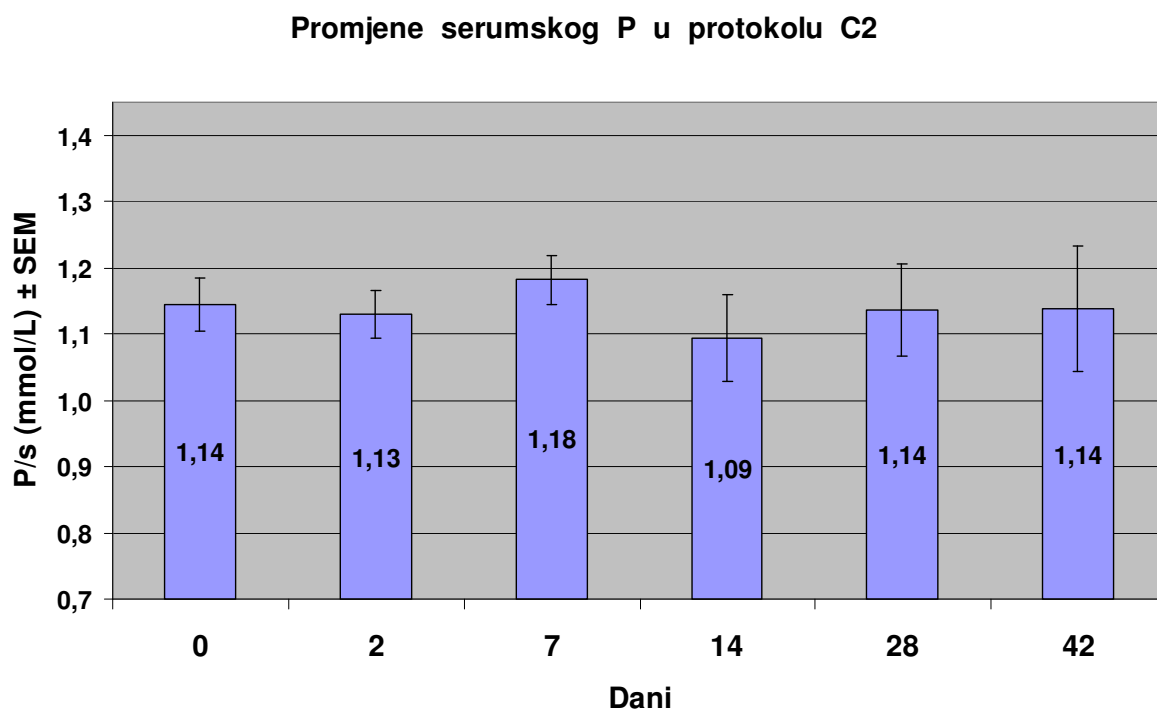


Vjerojatnost da promjena TSH djeluje na serumske vrijednosti kalcija i fosfora koje bi mogle utjecati na koštanu pregradnju isključili smo kontrolom navedenih parametara tijekom 42 dana od početka hormonske supstitucije levotiroksinom. Prosječne vrijednosti Ca/s tijekom smanjenja TSH u protokolu C2 bile se relativno niske s postepenim smanjenjem od početnih  $2,18 \pm 0,06$  mmol/L do  $2,12 \pm 0,05$  pmol/L u 28. danu testa što je niže za 2,8% i nije statistički značajno ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.2.11.). Prosječne vrijednosti P/s također nisu značajnije oscilirale ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.2.12.).

Slika 5.4.2.11. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti Ca ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



Slika 5.4.2.12. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti P ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C2 tijekom 42 dana (0., 2., 7., 14., 28. i 42. dan) nakon početka tireosupresivne terapije ( $P > 0,05$ ).



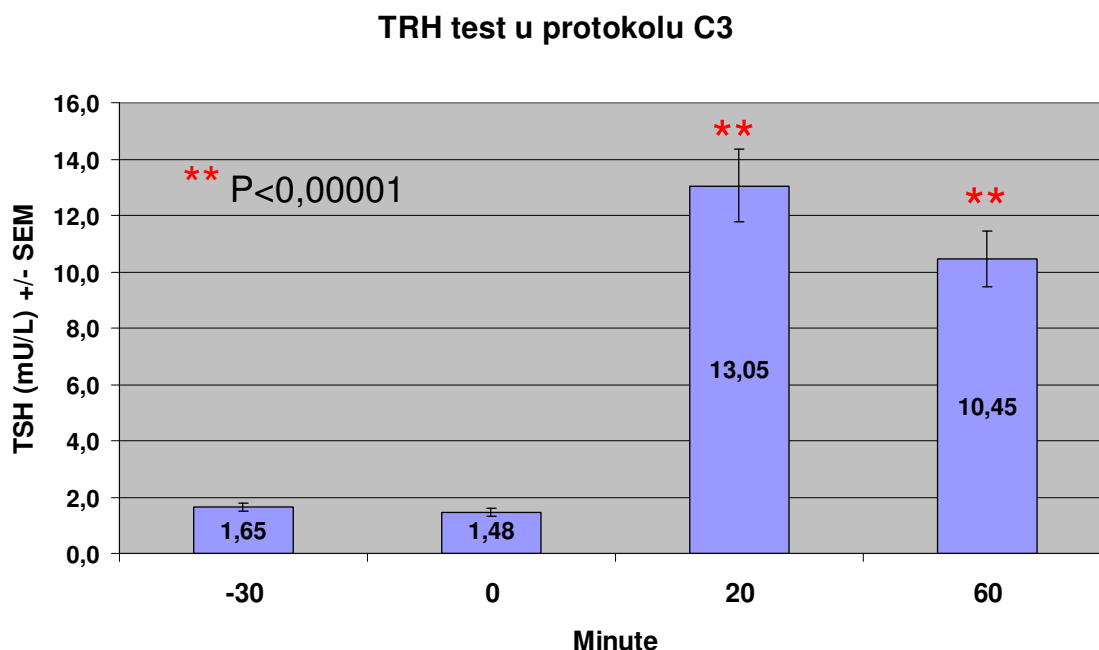
### 5.4.3. Učinak jednokratne stimulacije endogenog TSH pomoću tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH) na TSH, hormone štitnjače, biljege koštane pregradnje i druge metaboličke parametre u pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom (protokol C3)

U protokolu jednokratne stimulacije endogenog lučenja TSH (protokol C3) pomoću tireotropnog hormona tj. Protirelina (TRH 0,2 mg, Ferring) uključili smo 33 žene postmenopauzalne dobi s DXA potvrđenom osteoporozom prema kriterijima SZO. Prosječna životna dob ispitanica iznosila je  $66,36 \pm 1,57$  godina. Najmlađa ispitanica imala je 48 godina, a najstarija 85 godina i sve su prema anamnestičkim podacima i dostupnoj medicinskoj dokumentaciji zadovoljavale uključujuće i isključujuće kriterije za studiju. U dvije žene je nađena hipotireoza, a u dvije hipertireoza zbog čega su isključene iz ispitivanja. Prosječna T

vrijednost mineralne gustoće kosti lumbalne kralježnice (L1-L4) iznosila je  $-2,48 \pm 0,2$ , a vrata bedrene kosti (Neck)  $-2,23 \pm 0,135$ . Prosječna vrijednost Ca/s prije početka testa iznosila je  $2,24 \pm 0,013$  mmol/L, s najmanjom vrijednosti 2,07 mmol/L u jedne ispitanice i 2,11 mmol/L u dvije ispitanice, a najviša vrijednost iznosila je 2,36 mmol/L, tako da vrijednost kalcija niti u jedne ispitanice nije bila veća od gornje granice normale. Prosječna vrijednost P/s prije početka testa iznosila je  $1,03 \pm 0,026$  mmol/L i u svih ispitanica vrijednosti su bile u očekivanim granicama normale. Vrijednosti ukupne alkalne fosfataze prije početka studije najviše su odstupale od prosječne koja je iznosila  $65,88 \pm 2,95$  U/L. Niti jedna pacijentica nije imala povišene vrijednosti alkalne fosfataze u serumu što bi moglo ukazivati na pojačanu pregradnju kosti, a u 12 od 27 (44,4%) ispitanica vrijednosti su bile niže od očekivanih (granica normale), što nije bilo od kliničke važnosti.

Prema protokolu (C3) istražuje se porast endogenog lučenja TSH u TRH testu, kao i djelovanje jednokratne stimulacije endogenog TSH na vrijednosti ukupnih i slobodnih hormona štitnjače, TSH, na serumske biljege koštane pregradnje (CTX, OC, BAP) u razdoblju od 2 tjedna nakon primjene TRH u dozi od 0.2 mg i.v. u eutireotičnih ispitanica s postmenopauzalnom osteoporozom (Slika 4.4.). Ispitali smo veličinu izlučivanja TSH iz štitne žlijezde nakon jednokratne stimulacije s 0,2 mg tireotropina i.v., a prosječna bazalna vrijednost TSH iznosila je  $1,65 \pm 0,16$  mU/L u vremenu -30. min. i  $1,48 \pm 0,14$  mU/L u 0. minuti testa, a između tih vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.3.1.). Stimulacija pomoću TRH dovela je do porasta vrijednosti TSH na  $13,05 \pm 1,29$  mU/L u 20. minuti, a potom blagog smanjenja vrijednosti TSH na  $10,45 \pm 0,99$  mU/L u 60. minuti testa. Maksimalni porast TSH nakon 20 minuta testa iznosio je prosječno 8,8 puta u odnosu na početnu vrijednost u 0. minuti ( $P < 0,00001$ ) što smatramo vrlo dobrim za zdrave ispitanike.

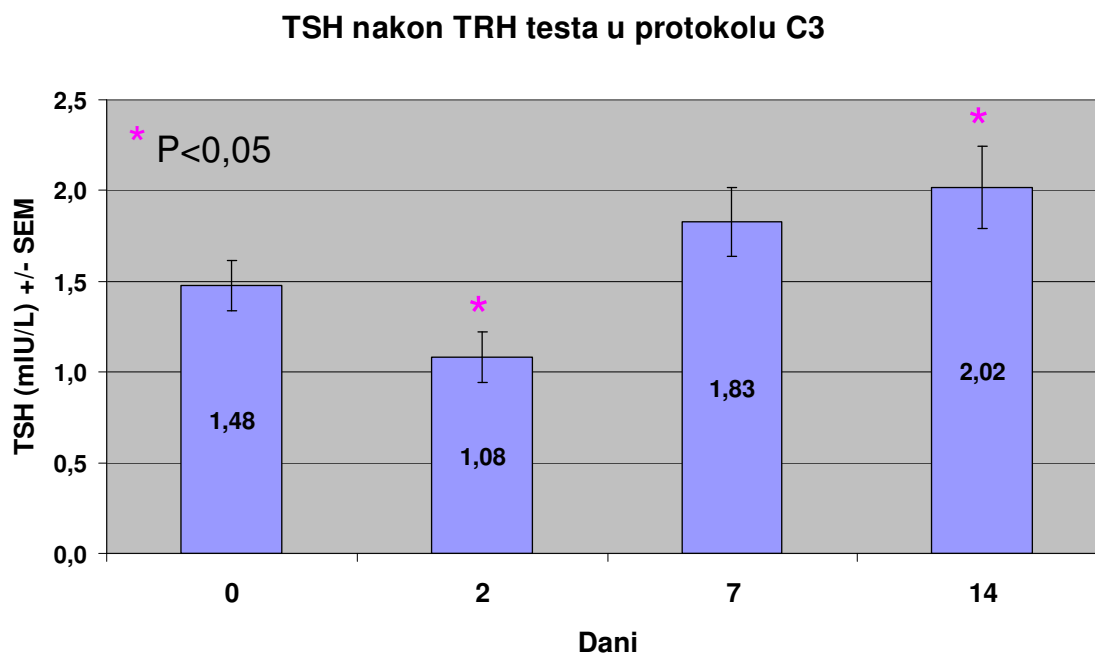
Slika 5.4.3.1. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti TSH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom testa (-30, 0, 20 i 60 min.) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. (\*\*  $P < 0,00001$ ).



Početna vrijednost TSH 0. dan, od  $1,48 \pm 0,14$  mU/L drugi dan je snižena na  $1,08 \pm 0,14$  mU/L, da bi se potom 7. dan po TRH testu povećala na  $1,83 \pm 0,19$  mU/L i 14. dan na  $2,02 \pm 0,23$  mU/L (Slika 5.4.3.2.). Drugi dan nakon primjene 0,2 mg TRH i.v. došlo je do značajnog smanjenja lučenja TSH u serumu za 27% ( $P < 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost, dok je 7. dan od primjene Protirelina TSH vrijednost porasla za 23,6 % ( $P > 0,05$ ), a 14. dan porast prema početnoj vrijednosti iznosio je 36,5% ( $P < 0,05$ ). Ako se uspoređuje porast TSH 7. i 14. dan u odnosu na sniženu vrijednost TSH koja je postignuta 2. dan, tada je taj porast bio značajno veći tj. iznosio je 69,4% odnosno 87% ( $P < 0,01$ ). (Slika 5.4.3.2.)

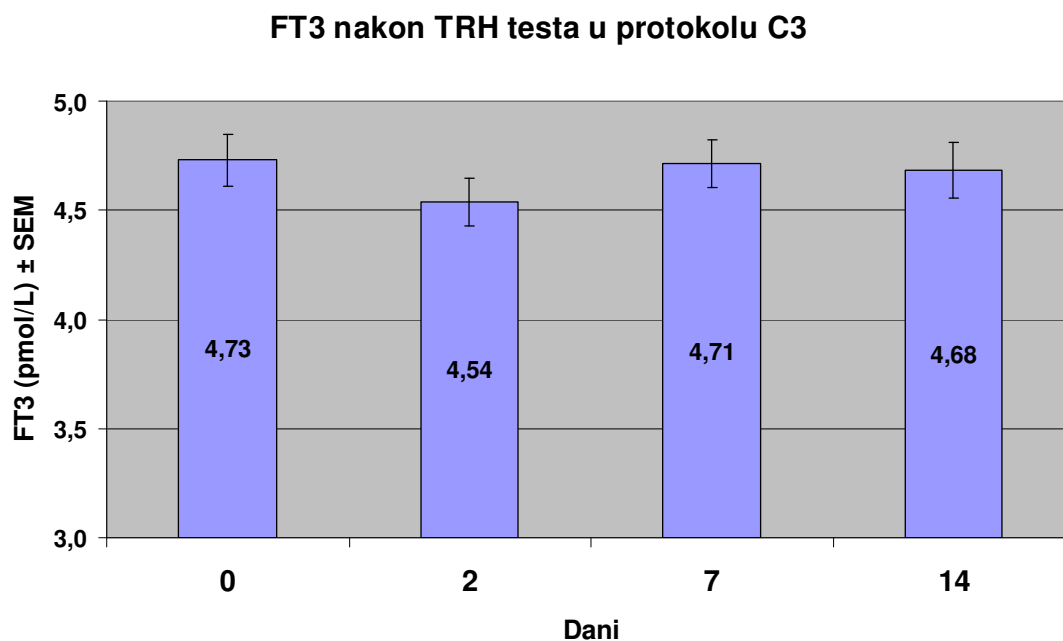


Slika 5.4.3.2. Prikazuje promjenu serumske vrijednosti TSH ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. (\*  $P < 0,05$ ).



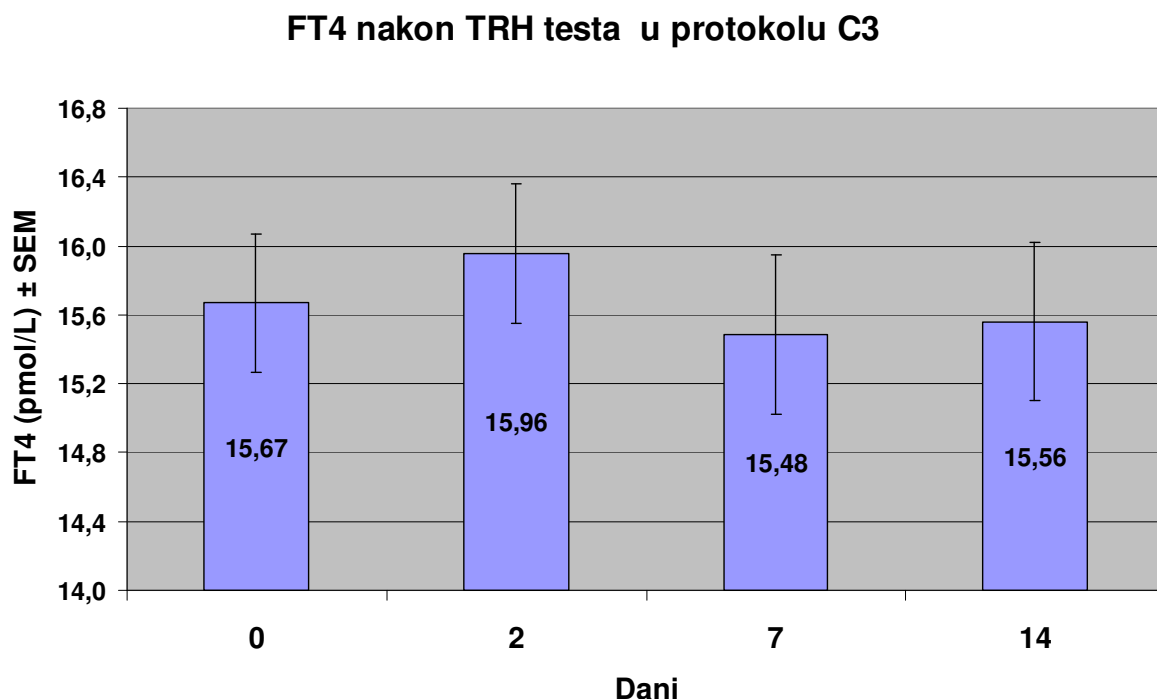
Obzirom na jednokratni porast serumskog TSH u TRH testu od gotovo 9 puta na početku studije istražili smo kakav je to imalo učinak na lučenje hormona iz štitnjače. Prosječna početna vrijednost FT3 od  $4,73 \pm 0,12$  pmol/L drugi dan je snižena na  $4,54 \pm 0,11$  pmol/L tj. za -4% prema početnoj, da bi potom 7. dan po TRH testu gotovo dostigla početnu vrijednost s  $4,71 \pm 0,11$  pmol/L (-0,4%) i 14. dan s  $4,68 \pm 0,13$  pmol/L (-1,1%). Sve promjene nisu bile statistički značajne ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.3.3.). U odnosu na sniženu vrijednost FT3 od 2. dana, porast FT3 7. i 14. dana testa bili su znatno veći i iznosili su 3,7% odnosno 3,1%, no ni te promjene nisu bile statistički značajne ( $P > 0,05$ ).

Slika 5.4.3.3. Prikazuje promjenu vrijednosti slobodnog trijodtironina (FT3;  $X \pm SEM$ ) u serumu u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



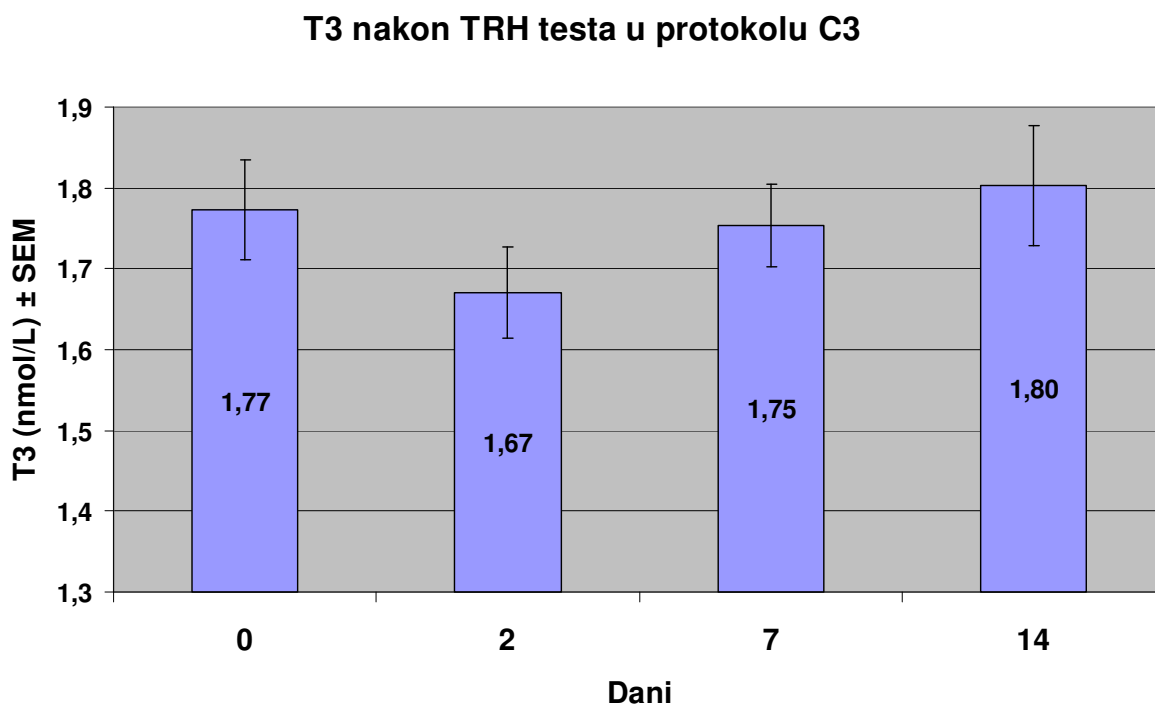
Vrijednosti FT4 su pokazale potpuno drugačiji odgovor na TRH stimulaciju, i to takav da je od početne prosječne vrijednosti  $15,67 \pm 0,4$  pmol/L 0. dana, došlo do porasta serumske vrijednosti FT4 na  $15,96 \pm 0,41$  pmol/L tj. za 1,9% prema početnoj vrijednosti, da bi se potom 7. i 14. dan po TRH testu FT4 smanjio ispod prosječnih početnih vrijednosti tj. 7. dan na  $15,48 \pm 0,46$  pmol/L (-1,2%) i 14. dan na  $15,56 \pm 0,46$  nmol/L (-0,7%), a promjene nisu bile statistički značajne ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.3.4.). U odnosu na povišenu vrijednost FT4 od 2. dana, sniženje FT4 7. i 14. dana testa bili su znatno veći i iznosili su 3% odnosno 2,5%, no ni te promjene nisu bile statistički značajne ( $P > 0,05$ ).

Slika 5.4.3.4. Prikazuje promjenu vrijednosti slobodnog levotiroksina (FT4;  $X \pm SEM$ ) u serumu u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



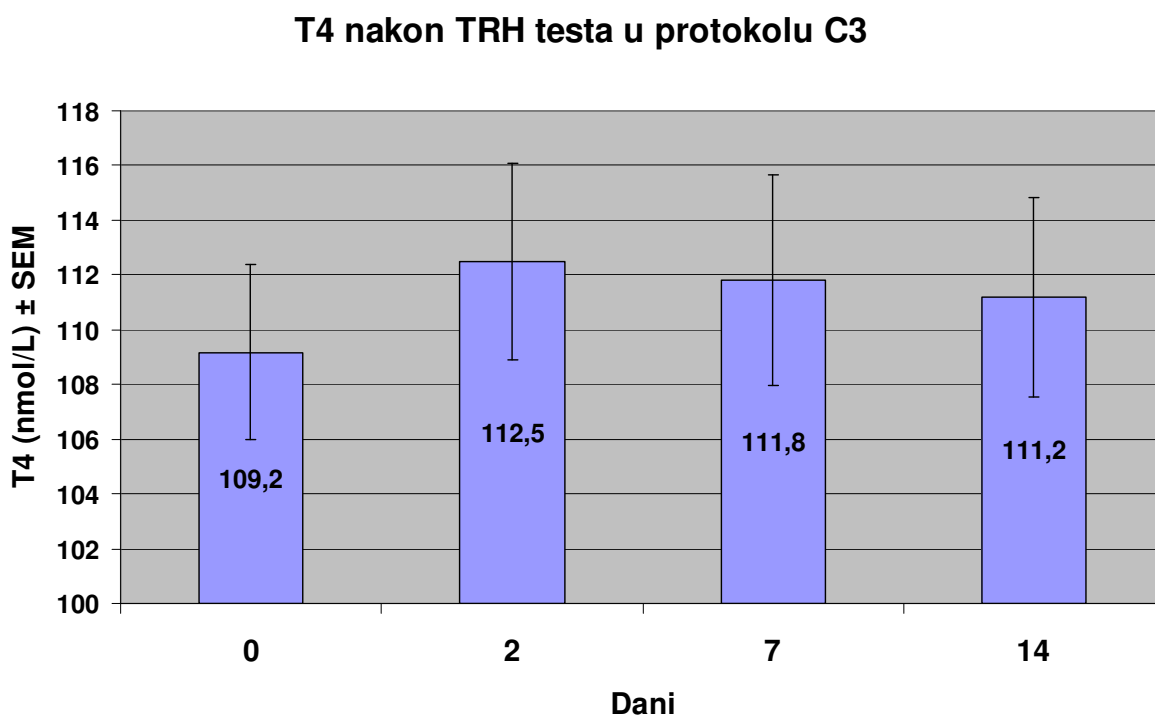
Obzirom da su slobodne frakcije trijodtironina i tiroksina klinički značajno pouzdanije, učinili smo kontrolu ukupnih frakcija samo u 24 pacijentice. Prosječna početna vrijednost T3 od  $1,77 \pm 0,06$  nmol/L je drugi dan snižena na  $1,67 \pm 0,06$  nmol/L, da bi potom 7. dan po TRH testu porasla na  $1,75 \pm 0,05$  nmol/L i 14. dan na  $1,8 \pm 0,07$  nmol/L (Slika 5.4.3.5.). Drugi dan nakon primjene 0,2 mg TRH i.v. došlo je do smanjenja lučenja T3 u serumu za 5,6% ( $P > 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost, dok je 7. i 14. dan od primjene testa T3 vrijednost iznosila prema početnoj vrijednosti -1,1% odnosno +1,7% (oboje  $P > 0,05$ ). Ako se uspoređuju u odnosu na sniženu vrijednost T3 od 2. dana, tada je porast 7. i 14. dana značajno veći tj. iznosi je 4,8% odnosno 7,8% (oboje  $P > 0,05$ ). Odgovor ukupnog i slobodnog T3 na TRH stimulaciju bio je vrlo sličan, tj. drugi dan ispitivanja došlo je do smanjenja serumske vrijednosti T3, da bi se 7. i 14. dan vratile na početne vrijednosti, a promjene nisu bile statistički značajne.

Slika 5.4.3.5. Prikazuje promjenu vrijednosti T3 ( $X \pm SEM$ ) u serumu u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



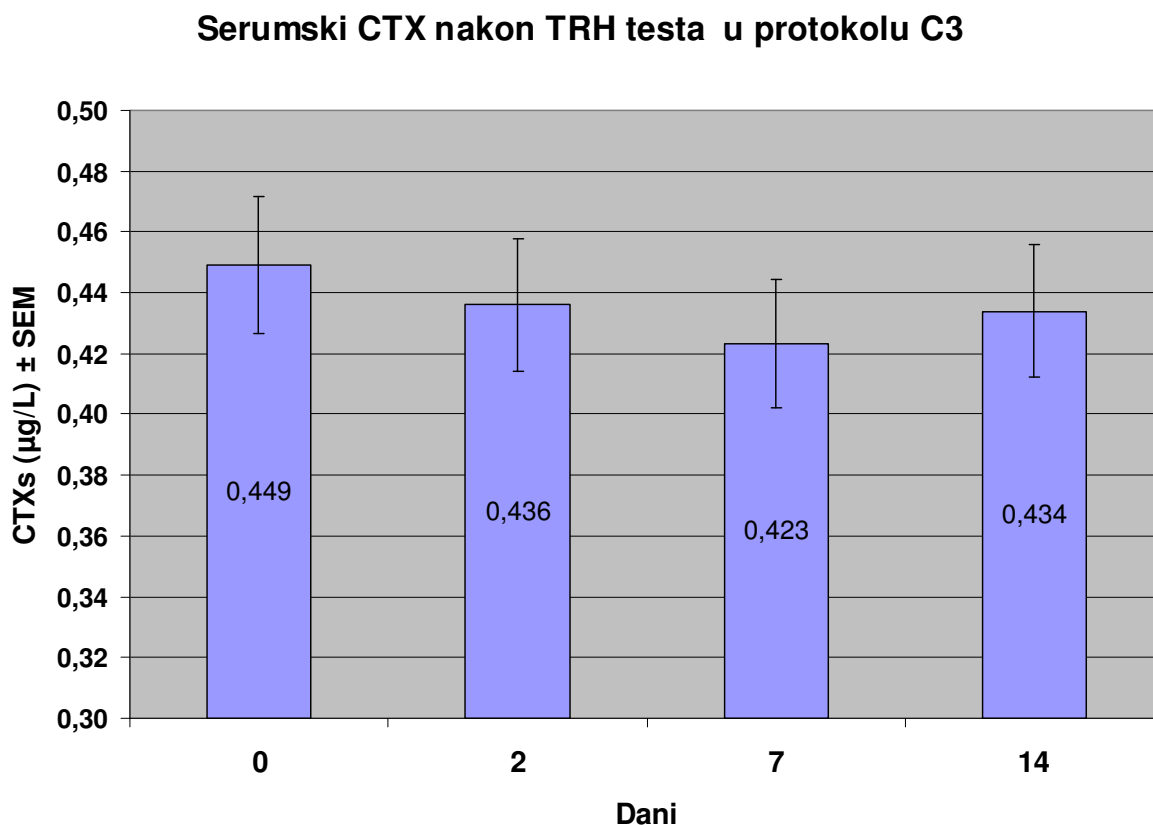
Vrijednosti T4 su pokazale drugačiji odgovor na TRH stimulaciju, identično kao i FT4 to takav da je od početne prosječne vrijednosti  $109,2 \pm 3,2$  nmol/L tijekom drugog dana ispitivanja došlo do porasta T4 na  $112,5 \pm 3,59$  nmol/L tj. za 3,0% u odnosu na početnu vrijednost ( $P > 0,05$ ). Vrijednosti su se nešto smanjile 7. i 14. dan i iznosile su  $111,8 \pm 3,85$  nmol/L odnosno  $111,2 \pm 3,66$  nmol/L tj. porast vrijednosti T4 bio je 2,4% odnosno 1,8% u odnosu na početnu vrijednost, a promjene nisu bile statistički značajne ( $P > 0,05$ ) (Slika 5.4.3.6.).

Slika 5.4.3.6. Prikazuje promjenu vrijednosti T4 ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



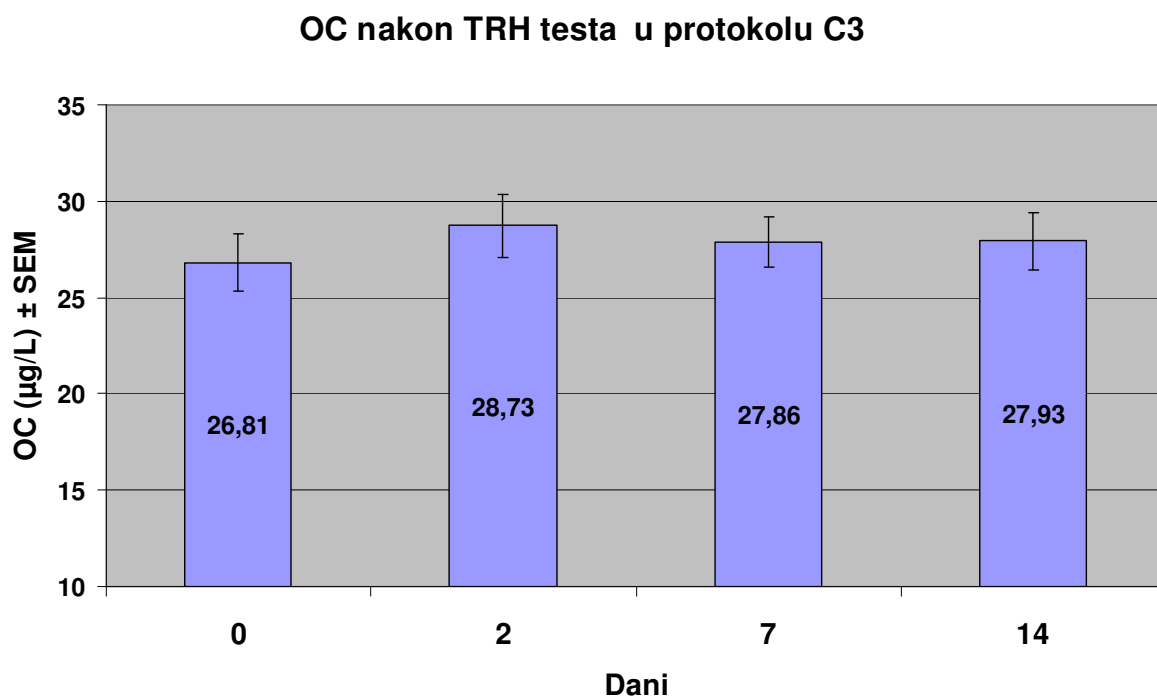
Obzirom na hipotezu da TSH ima izravan učinak na koštanu pregradnju od osobite važnosti je praćenje promjena serumskih biljega koštane razgradnje (CTX) i koštane izgradnje (OC). Analiza biljega koštane razgradnje, CTXs pokazuje prosječnu početnu vrijednost  $0,449 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$  koja je drugi dan po stimulaciji s TRH smanjena na  $0,436 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$ , da bi se 7. dan nastavila supresija u odnosu na početne vrijednosti CTXs tj.  $0,423 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$  odnosno 14. dan blago porasla na  $0,434 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$  (Slika 5.4.3.7.). Drugi dan nakon TRH stimulacije došlo je blagog smanjenja lučenja CTXs za 2,9%, što se nastavlja i 7. dan nakon TRH testa za 5,8%, dok je 14. dan od početka testa došlo do porasta lučenja CTXs odnosno 3,3% manje u odnosu na početnu vrijednost. Jedna ispitanica (3%) imala je suprimirani CTXs koji je iznosio  $0,14 \mu\text{g/L}$ , a sve ostale su imale CTXs u očekivanim vrijednostima za postmenopauzalnu osteoporozu. Sve promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ).

Slika 5.4.3.7. Prikazuje promjenu vrijednosti CTXs ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



Analiza biljega koštana izgradnje, OC pokazuje prosječnu početnu vrijednost  $26,81 \pm 1,49 \mu\text{g/L}$  koja je drugi dan porasla na  $28,73 \pm 1,64 \mu\text{g/L}$ , da bi se potom 7. i 14. dan po TRH testu blago smanjila prema početnim, no ostaju još uvijek više od početnih vrijednosti tj.  $27,86 \pm 1,3 \mu\text{g/L}$  odnosno  $27,93 \pm 1,5 \mu\text{g/L}$  (Slika 5.4.3.8.). Drugi dan nakon stimulacije s TRH testom došlo je do blagog povećanja lučenja OC u serumu za 7,2% ( $P > 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost, dok je 7. i 14. dan od primjene testa vrijednost OC porasla samo za 3,9% odnosno 4,2% (oboje  $P > 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost osteokalcina. Radi se o vrlo blagom porastu OC prema kojem nije dokazana statistička značajnost.

Slika 5.4.3.8. Prikazuje promjenu vrijednosti OC ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).

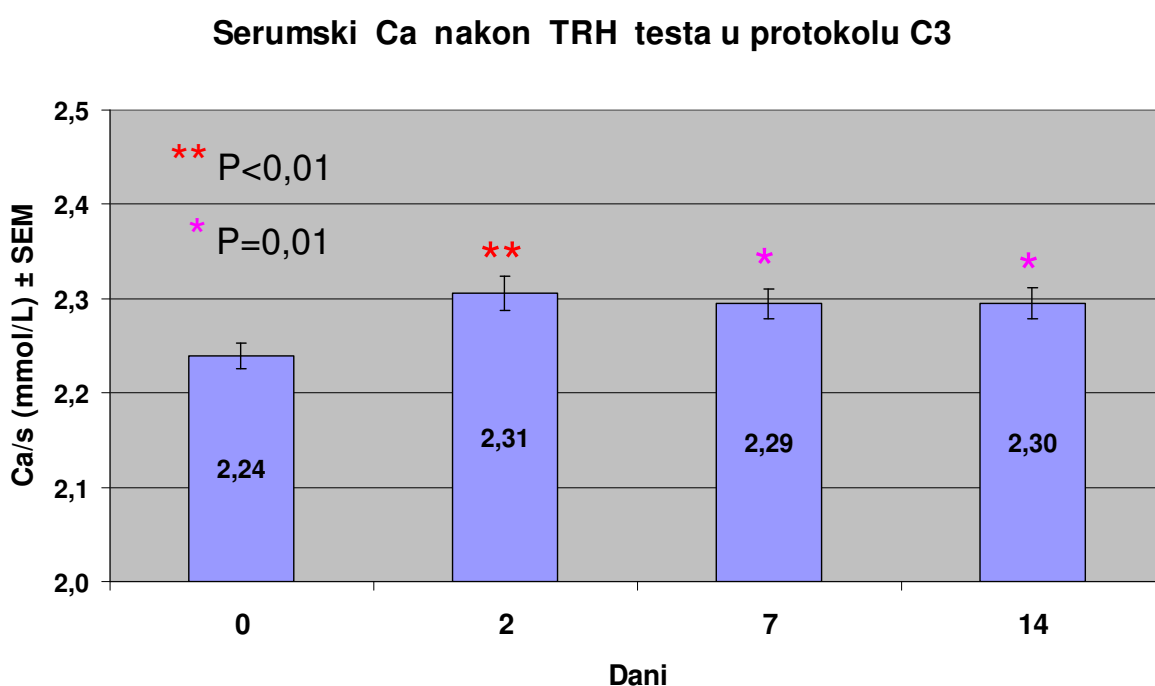


Iako vrlo blago, postignuta je dugotrajnija supresija biljega koštane razgradnje u serumu (CTXs) nakon jednokratne primjene TRH tj. kratkotrajne endogene stimulacije TSH, dok je biljeg koštane izgradnje (OC) praktično ostao nepromijenjen, vrlo mali, statistički nesignifikantan porast. Nije bilo supresije koštane izgradnje čime bio se mogao objasniti povoljan učinak jednokratnog pulsog davanja egzogenog TSH. Ponavljanim pulsним davanjem egzogenog TSH moguće bi se postigla jača supresija koštana razgradnje, bez supresije koštane izgradnje čime bi se postigao terapijski učinak.

Zanimljivo je ispitati da li je došlo do promjena u serumskim vrijednostima elektrolita koji su povezani s pregradnjom kosti kao što su kalcij i fosfor, obzirom da se radi o kratkotrajnoj endogenoj stimulaciji TSH. Analiza Ca/s pokazuje prosječnu početnu vrijednost od  $2,24 \pm 0,013$  mmol/L, dok su ostale ispitivane dane nakon endogene stimulacije s TSH prosječne vrijednosti Ca/s bile značajno više tj. 2. dana  $2,31 \pm 0,017$  mmol/L, 7. dana  $2,29 \pm 0,016$  mmol/L i 14. dana  $2,3 \pm 0,016$  mmol/L (Slika 5.4.3.9.). Drugi dan nakon primjene 0,2 mg TRH i.v. došlo je do značajnog povećanja Ca/s za 3,1% ( $P < 0,01$ ) u odnosu na početnu

vrijednost, dok je 7. dan vrijednost Ca/s porasla za 2,2% (P=0,01) i 14. dan za 2,7% (P=0,01) prema početnoj vrijednosti. Neočekivano je došlo do porasta serumske vrijednosti kalcija tijekom 14 dana nakon endogene stimulacije s TSH, bez statistički značajne promjene u koštanim biljezima pregradnje stoga, stoga ova promjena nema kliničkog objašnjenja.

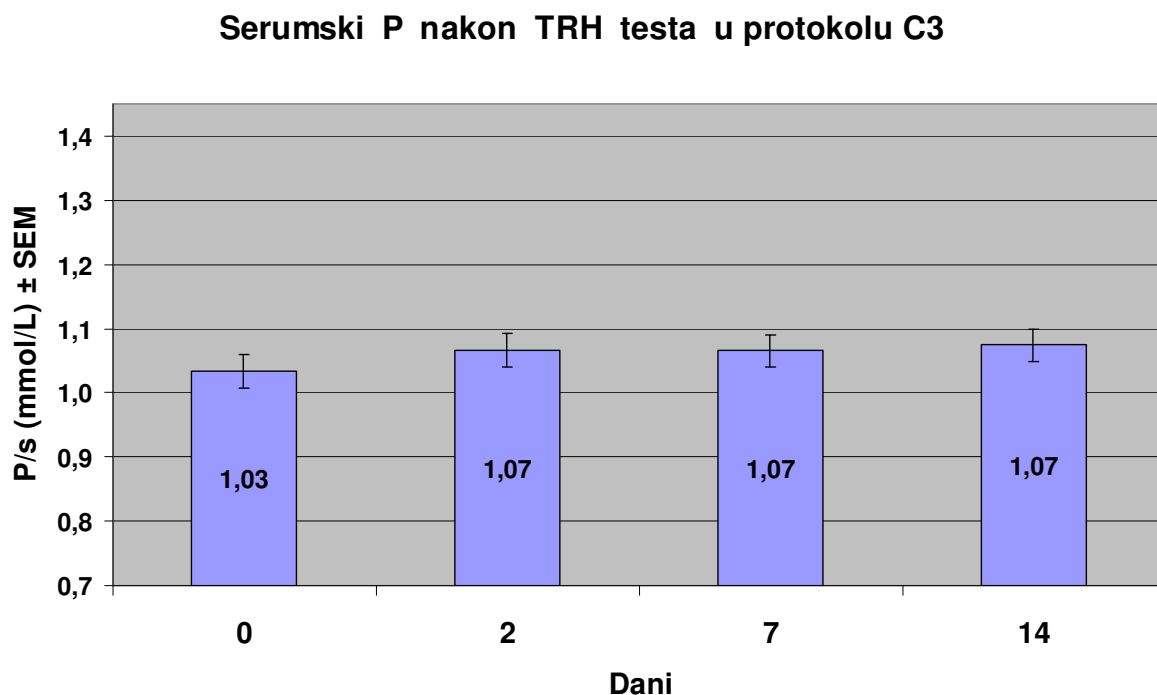
Slika 5.4.3.9. Prikazuje promjenu vrijednosti Ca/s ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. (\*\* P<0,01; \* P=0,01).



Prosječna početna vrijednost P/s iznosila je  $1,03 \pm 0,026$  mmol/L, dok su 2., 7. i 14. dana prosječne vrijednosti P bile identične i iznosile su 1,07 mmol/L s minimalnom razlikom u standardnoj pogrešci tj. 0,027 odnosno 0,025 i 0,025 mmol/L (Slika 5.4.3.10.). Porast P/s iznosio je 3,9% (P>0,05) u odnosu na početnu vrijednost. U odnosu na značajnu promjenu serumske vrijednosti kalcija nakon jednokratne stimulacije endogenog TSH, promjena serumske vrijednosti fosfora nije bila statistički značajna.



Slika 5.4.3.10. Prikazuje promjenu vrijednosti P/s ( $X \pm SEM$ ) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. ( $P > 0,05$ ).



U ranije učinjenim protokolima (C1 i C2) postupno i trajno povećanje ili sniženje TSH nije imalo utjecaja na BAP,  $1-25(OH)_2D_3$  i PTH. U protokolu C3 smo tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije pomoću TRH u dozi 0,2 mg i.v. za manji broj ispitanica analizirali promjene navedenih parametara što je prikazano u tablici 5.4.3.1. Početne serumske vrijednosti ispitivanih parametara bile su niže od ispitivanih 2., 7. i 14. dan, no niti jedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost u t-testu prema početnim vrijednostima ( $P > 0,05$ ).

Tablica 5.4.3.1. Prikazuje serumske vrijednosti BAP, 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i PTH (X±SEM) za različiti broj ispitanika (N) u protokolu C3 tijekom 14 dana (0., 2., 7. i 14. dan) nakon jednokratne stimulacije s TRH u dozi 0,2 mg i.v. (P>0,05).

<b>Naziv</b>	<b>x±SEM</b>	<b>0.</b>	<b>2.</b>	<b>7.</b>	<b>14.</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
<b>BAP</b>	X	11,80	12,40	12,50	13,00	<b>5</b>	<b>P&gt;0,05</b>
	SEM	1,45	1,51	1,35	1,92		
<b>1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	X	42,97	43,50	65,00	51,10	<b>3</b>	<b>P&gt;0,05</b>
	SEM	9,26	5,28	12,04	15,59		
<b>PTH</b>	X	40,59	49,67	48,62	54,22	<b>5</b>	<b>P&gt;0,05</b>
	SEM	3,78	5,01	5,40	10,40		

## 6. RASPRAVA

Osteoporoza je bolest starije životne dobi karakterizirana smanjenom koštanom masom i gubitkom mikroarhitekture kosti uz značajno povećani rizik za prijelome i invaliditet što, obzirom na demografska kretanja u razvijenim zemljama svijeta, predstavlja vrlo važan javno-zdravstveni i društveno-ekonomski problem. Povećanje dobne strukture populacije i način života u slijedećih 50 godina udvostručiti će broj bolesnika, a potvrđene su spoznaje o neadekvatnoj zbrinutosti bolesti, iako potrošnja nacionalnih fondova za liječenje osteoporoze i njenih komplikacija unatrag 5-8 godina bilježi eksponencijalni rast. Potrošnja za liječenje osteoporotičnih prijeloma u SAD-u se procjenjuje na 20 milijardi dolara, a u Europskoj uniji oko 30 milijardi dolara godišnje (302). Unatrag 8 godina u Hrvatskoj se ušesterostručio broj bolesnika liječenih od osteoporoze (2000.g. 5.543, a 2007.g. 31.088), a to predstavlja samo 15,6% očekivanog broja bolesnika (PharMIS, veljača 2008.) (40). Osteoporoza je „tiha epidemija“ obzirom da veći dio bolesnika nema simptoma, a zahvaća oko 10% populacije. Naime 50% žena i 20% muškaraca bijele rase starijih od 50 godina ima tijekom života rizik doživjeti osteoporotični prijelom (303). Zaista, svaka šesta žena bijele rase ima rizik doživjeti osteoporotični prijelom, a svaka deveta ima rizik doživjeti karcinom dojke (254). Unatrag 10 godina postignut je veliki napredak u razumijevanju epidemiologije, patofiziologije, prevencije i liječenja osteoporoze s tendencijom još većih spoznaja, a velika su očekivanja od novih lijekova za osteoporozu (304).

Značaj osteoporoze i bolesti štitnjače očituje se u velikom broju bolesnika starije životne dobi, osobito ženske populacije, te u mogućnosti međusobnog utjecaja. Naime u starijoj životnoj dobi bolesti osteoporoza i hipertireoza se često mogu javiti zajedno, stoga je izuzetno važno razumjeti moguće patofiziološke mehanizme u nastanku i međudjelovanju tih bolesti. Također se mora imati na umu da su obje bolesti vrlo učestale, osobito u ženskoj u populaciji, te da se još češće nalaze i neovisno jedna od druge. Ubrzana pregradnja kosti i posljedična osteoporoza u hipertireotičnom stanju organizma, te učinak hormona štitnjače na diferencijaciju i funkciju koštanih stanica opisani su u nizu „in vitro“ i kliničkih studija, te se praktično dugo vremena smatralo herezom razmišljati drugačije (305). Više od 10% postmenopauzalnih žena u SAD-u uzima nadomjestak hormona štitnjače. Njih 20% se predoziraju uzrokujući subkliničku hipertireozu, a sada postoje jasni dokazi da na koštanu pregradnju izravno i negativno utječe niski serumski TSH (306).

Izravno djelovanje TSH na koštanu pregradnju pokazala je studija s haploinsuficijentnim miševima za TSH-R, kada se uz normalne vrijednosti hormona štitnjače nalazi osteoporozna i fokalna osteoskleroza (272). Miševi s izbačenim TSH-R imaju jaku osteoporozu. Heterozigoti TSH-R<sup>+/-</sup> miševi su eutireodni s normalnim vrijednostima T3, T4 i TSH, ali ipak imaju značajno smanjenje koštane gustoće. Nasuprot, dodatak tireoidnih hormona homozigotnim TSH-R<sup>-/-</sup> miševima normalizira tjelesnu težinu, ali ne i koštanu masu. Kako u TSH-R<sup>-/-</sup> miševa s teškom osteoporozom nalazimo i fokalnu osteosklerozu, područja kosti pojačane gustoće što implicira brzu izgradnju, jasno je da TSH ima mogućnost učinka na osteoblaste i osteoklaste. Gubitak koštane mase posredovan je povećanom ekspresijom osteoklastogenog citokina TNF- $\alpha$ , tako se nalazi povećana osteoklastogeneza u manjku TSH-R, a TSH inhibira stvaranje osteoklasta. TSH djeluje putem usporavanja aktivnosti NF $\kappa$ B i JNK/c-jun, dva važna osteoklastogena signala stimuliranih djelovanjem RANK-L i TNF $\alpha$  (272), dok estrogeni djeluju inhibicijom samo JNK/c-jun puta (307, 308). TSH smanjuje diferencijaciju osteoklasta mehanizmom smanjenja jezgrinog c-jun, čak ne mijenjajući c-fos razinu, što uzrokuje smanjenje homo i heterodimernih formi, te tako smanjuje transkripciju važnih osteoklastnih gena za AP-1 mjesto, kao što su TRAP i katepsin K (309). Mehanizam djelovanja TSH na osteoklaste bar je dijelom pojašnjen, no kako nastaje fokalna osteoskleroza (ektopično stvaranje kosti, izgradnja bez prethodne razgradnje) u homozigotnih miševa za TSH-R<sup>-/-</sup> i kakvu ulogu u tome ima TSH? Slične promjene se mogu naći u Pagetovoj bolesti. S druge strane u miševa s isključenim  $\alpha$  i  $\beta$  receptorima za hormone štitnjače nalaze se samo očekivani poremećaji u ploči rasta, bez poremećaja pregradnje kosti (271). U stvari se nalazi da TR reguliraju rast i razvoj skeleta, a ne skeletnu pregradnju ! Sukladno tome, hipotireoidizam u dječjoj dobi uzrokuje značajno kašnjenje u razvoju skeleta, dok je tireotoksikoza u odrasloj dobi povezana s 3-4 puta većim rizikom od osteoporotičnog prijeloma (310). TR $\alpha$  je dominantna izoforma u kosti, gdje ima 15 puta veću ekspresiju od TR $\beta$ , koji se nalazi uglavnom u hipotalamusu i hipofizi gdje regulira negativni feedback TRH i TSH (310). Klinička implikacija navedenih radova bila je povezati TSH, a ne hormone štitnjače, s gubitkom koštane mase u odraslih ljudi, osobito osoba s ubrzanom pregradnjom kosti, tj. postmenopauzalnih žena. Povećanje koštane mase i kortikalne širine nalazi se u bolesnika s hipotireozom i visokim TSH, stoga su neobični nalazi povećanog rizika za prijelom u hipotireozi.

Poznato je da gubitak koštane mase tijekom hipertireodizma može biti reverzibilan, ako se funkcija štitnjače normalizira. Velika studija rizika od prijeloma u pacijenata s hipertireozom (11.776) i hipotireozom (4.473) pokazala je male, no statistički značajne rizike

u bolestima štitnjače, dok učinak kirurške terapije hipertireoze pokazuje smanjenje rizika od prijeloma (266). Nasuprot tome, druge studije su pokazale kako je došlo do oporavka koštane mase tri godine nakon izliječenja hipertireoze (311, 267). Drugi su autori potvrdili da je mutacija TSH-R u ljudi odgovorna za osteopeniju s povišenim vrijednostima osteokalcina i N-telopeptida (312). Slično navedenom, mutacije TSH-R G498S, R450H i u manjoj mjeri R519C pokazuju osteoporozu s visokom pregradnjom, dok pacijenti s TR mutacijom imaju normalnu gustoću kosti i serumske biljege (313). Smatra se da pacijenti koji dugo vremena uzimaju hormone štitnjače, održavajući TSH u normalnim granicama (hormonska nadomjesna terapija) nemaju povećani rizik od nastanka osteoporoze.

### 6.1. Pretklinička istraživanja

Niske doze humanog TSH, 0.7 i 7  $\mu$ g, su učinkovitije za očuvanje kosti nakon ovarijektomije, osobito u stražnjih udova. Nakon 8 tjedana terapije BMD je na svim mjerenim područjima (cijelo tijelo, stražnji udovi i slabinska kralježnica) bio značajno povećan u životinja koje su dobivale 0.7  $\mu$ g humanog TSH u odnosu na OVX štakore. Razlog za kasni odgovor koštanog sustava na humani TSH bi mogao biti objašnjen proizvodnjom antitijela na humani protein. *Ex vivo* DXA mjerenja su pokazala da je BMD proksimalnog vrata bedrene kosti dostigao SHAM vrijednosti u životinja koje su dobivale 0.7 i 7  $\mu$ g humanog TSH. Nije bilo značajnih razlika u tjelesnoj težini između pokusnih skupina, te nisu primijećene nikakve nuspojave. Stoga, TSH bi se mogao koristiti u prevenciji gubitka kosti.

Upoznavajući stanične mehanizme izravnog djelovanja TSH potvrđujemo učinak na obje komponente stanične pregradnje, stvaranje i razgradnju kosti. Učinak rekombinatnog TSH na supresiju osteoklasta i osteoblasta pokazuje odgovarajući fenotip koji se nalazi u TSH-R<sup>-/-</sup> miševa, što potvrđuje ulogu peptida kao „hormona koji usporava kost“ (bone suppressing hormone) (274). TSH-R spadaju u obitelj receptora sa sedam transmembranskih G-vezanih proteina, isto kao i receptori za kalcitonin i paratireoidni hormon (PTH), a oba reguliraju koštanu pregradnju. Iako se receptor za kalcitonin nalazi na obje koštane stanice, njegova primarna funkcija je inhibicija koštane razgradnje, smanjenjem motiliteta i sekrecije kiselina i proteaza osteoklasta (314). Receptori za PTH su jako izraženi samo na osteoblastima, a omogućavaju dvojni učinak PTH (315). Intermitentna primjena rezultira anaboličkim učinkom (koštanom izgradnjom), a kontinuirana primjena povećava ekspresiju RANKL koji stimulira diferencijaciju osteoklasta i koštanu resorpciju (razgradnju kosti). Sva

tri hormona: TSH, kalcitonin i PTH djeluju preko sličnih koštanih transmembranskih receptora putem cAMP, fosfolipaze C i protein kinaze A. Koncept djelovanja TSH izgleda sličan paratireoidnom hormonu, kada se daje intermitentno izaziva anabolički učinak na kost. Pretkliničke studije pokušavaju utvrditi koje su to optimalne doze intermitentnog davanja rekombinantnog TSH koje će imati maksimalni učinak na skelet, a minimalni ili bez učinka na štitnjaču tj. postići eutireotično stanje (316, 279). Upotreba modela genetski modificiranih miševa s promjenama pojedinih gena i proteina otvorila je neslućene mogućnosti u ispitivanju uloge ključnih čimbenika u skeletnoj pregradnji u zdravlju i bolesti (317). Određivanje načina djelovanja, pitanje transmembranskih receptora sa sedam G-vezanih proteina, razlika u prenosu signala istih receptora u različitim stanicama važno je zbog mogućnosti terapijskog djelovanja u osteoporozi (274).

## 6.2. Epidemiološko istraživanje

Poznato je da hipertireoza sa suprimiranim TSH uzrokuje osteoporozi. Postavlja se pitanje je li subklinička hipertireoza, s normalnim vrijednostima hormona štitnjače i niskim ili nisko-normalnim vrijednostima TSH uzrokuje gubitak koštane mase. Obzirom na postavljeno pitanje utjecaja TSH na poremećaje koštane pregradnje usporedili smo TSH vrijednosti i denzitometrijsko mjerenje mineralne gustoće kosti kralježnice i vrata bedrene kosti u 940 postmenopauzalnih žena, u kojih su isključene sve druge poznate bolesti ili stanja koja bi mogla utjecati na mineralnu gustoću kosti. Uglavnom su bile žene prosječne tjelesne težine ( $64 \pm 8,3$  kg) i nešto nižeg rasta ( $157 \pm 5,9$  cm), a značajno su lošiji nalazi gustoće kosti bili u kralježnici nego vratu bedrene kosti (T-sc.  $-3,0$  vs.  $-2,4$ ). Nakon isključenja 113 bolesnica koje su imale TSH izvan normalnih vrijednosti tj. 83 hipertireoze (8,8%) i 30 hipotireoza (3,2%), preostalih 827 eutireotičnih ispitanica je grupirano u 5 semikvintila prema vrijednosti serumskog TSH. Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima mineralne gustoće kosti kralježnice i vrata bedrene kosti u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti, no veoma je izraženo grupiranje pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom u područje niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH. Tako je u donjoj  $\frac{1}{4}$  TSH vrijednosti (0,3-1,5) bilo  $\frac{3}{4}$  pacijentica s osteoporozom, dok je u gornje  $\frac{3}{4}$  TSH vrijednosti bilo svega 24,7% pacijentica s osteoporozom. Čak 83,6% pacijentica s osteoporozom imale su TSH manje od 2 mIU/L. Ispitanice s hipertireozom imale su značajno niže vrijednosti gustoće kosti u kralježnici i kuku u odnosu na bolesnice s hipotireozom (BMD LS 0,716/0,721 i BMD neck 0,577/0,605). U

različitim dobnim skupinama, do 65. godine života i iznad te dobi, i različitim područjima mjerenja (LS kralježnica i vrat bedrene kosti) našli smo sličnu raspodjelu slabije mineralizirane kosti tj. razlike nisu bile statistički značajne. Značajno je slabija mineralna gustoća kosti bila u kralježnici gdje je 88% postmenopauzalnih žena imalo potvrđenu osteoporozu prema kriterijima SZO-a, dok je u vratu bedrene kosti potvrđenu dijagnozu imalo 51,5% postmenopauzalnih žena ! Navedena razlika se objašnjava ranijim gubitkom koštane mase u spužvastoj kosti koju predstavlja kralježnica, u odnosu na kortikalnu kost koju predstavlja vrat bedrene kosti, što je sukladno patofiziološkom mehanizmu nastanka i razvoja osteoporoze. Visoka učestalost potvrđene osteoporoze DXA mjerenjem mineralne gustoće kosti u slabinskoj kralježnici potvrđuje da je navedeno područje mjerenja visoko specifično za dijagnozu osteoporoze.

Međutim, učestalost sniženih vrijednosti mineralne gustoće kosti u žena s osteoporozom i u onih s osteopenijom puno je veća u postmenopauzalnih žena s niskim i nisko normalnim TSH vrijednostima (TSH <2,0 mIU/L) neovisno o dobi i području mjerenja. Učestalost iznosi 83,5-83,8 % (LS-neck) za pacijentice mlađe od 65 godina i 80,1-84,9% za pacijentice u dobi 65 i više godina, iako  $\chi^2$  testom nije utvrđena statistička značajnost. Također nije bilo razlike u rezultatima kada su uključene samo eutireotične pacijentice odnosno s urednim vrijednostima serumskog TSH. Tako visoki postotak učestalosti osteoporoze u skupini niskih TSH vrijednosti (85%) bez statističke značajnosti tumačimo prethodnim selekcioniranjem postmenopauzalnih žena s niskom mineralnom gustoćom kosti kod kojih nije moguće statistički dokazati razliku koja je deskriptivno vrlo jasna (Tablica 5.2.2. i Slika 5.2.3.). Praktično šest od sedam ispitanica s dijagnozom osteoporoze imalo je nisko normalne vrijednosti TSH (0,3-2,0 mIU/L) u serumu. To je u skladu s prethodno objavljenim opažanjima na ukupnoj populaciji žena različite životne dobi i mineralne gustoće kosti.

Vrlo slične podatke nalazimo u analizi osteoporotičnih prijeloma u 680 žena s postmenopauzalnom osteoporozom, od kojih je 85,4% imalo 1, 2, 3, 4 ili 5 i više kompresivnih prijeloma grudnih ili slabinskih kralježaka. Radiološkom analizom prijeloma s klasifikacijom prema Genantu nalazimo 496 pacijentica s prijelomom bar jednog kralješka (85,4%) čiji je TSH bio nisko normalan (0,3-2,0 mIU/L), što je vrlo visoko i slično navedenim podacima o gustoći kosti. Također je zanimljivo da je u istoj skupini najviše bilo pacijentica koje su imale 2 prijeloma (33,6%), zatim onih s jednim prijelomom (24,4%) i onih s 3 prijeloma (17,2%). U području gornje 2/3 normalnih TSH vrijednosti (2,01-5,5 mIU/L) bilo je svega 85 ispitanica s kompresivnim prijelomom (14,6%) ili tek svaka 7. pacijentica.

Ako se analizira prema mjestu osteoporotičnih prijeloma treba reći da su oni daleko češće bili u grudnoj (76%) nego u slabinskoj kralježnici (4,4%). Analiza regresije svih prijeloma pokazuje da postoji granična značajnost za broj prijeloma u žena s osteoporozom i niskim vrijednostima TSH. Te su razlike izraženije u području grudne, nego slabinske kralježnice. Povećana je vjerojatnost od novog prijeloma kralježka u žena s vrijednostima TSH manjim od 1 mU/L. Objašnjenje da nije potvrđena statistička značajnost u povezanosti TSH vrijednosti s učestalosti prijeloma je u tome što se radi o visoko selekcioniranoj populaciji, u kojoj je nađena visoka učestalost prijeloma u žena s nisko normalnim vrijednostima TSH, a ekstrapolacija rezultata nije moguća. Zaključujemo da TSH u skupini pacijentica s već dokazanom osteoporozom nije prediktor nastanka prvog, kao niti bilo kojeg slijedećeg prijeloma kralježka. TSH je prediktor samo u ukupnoj postmenopauzalnoj populaciji žena. Vrlo malo je objavljenih radova s korelacijom osteoporotičnih prijeloma i TSH vrijednosti, odnosno analize učestalosti i rasporeda osteoporotičnih prijeloma. Prema našim podacima u postmenopauzalnih žena s osteoporozom značajno su češći osteoporotični prijelomi u području grudne kralježnice, koja se inače rjeđe kontrolira u svrhu osteoporotičnog prijeloma, što mijenja kliničke smjernice u radiološkoj dijagnostici osteoporoze i njenih komplikacija.

Niski TSH, kao rizični čimbenik, potvrđen je u novijim epidemiološkim studijama. Istraživanje Onigate i sur. na bolesniku s hipotireozom zbog mutacije TSH receptora, kojemu su nadomješteni hormoni štitnjače supstitucijom, a nalazi se smanjena mineralna gustoća kosti potvrđuje izravni učinak TSH-R u ljudi (275). U pacijentica starijih od 65 godina (s pojačanom pregradnjom kosti), bez supstitucijske terapije, niska razina TSH može biti udružena s povećanim rizikom od prijeloma vrata bedrene kosti i kralježaka, dok u pacijenata koji uzimaju hormone štitnjače uz uredne vrijednosti TSH nema povećanog rizika od prijeloma (282). U nekim studijama prolongirana primjena većih doza hormona štitnjače rezultira manjim, ali statistički značajnim porastom gubitka koštane mase u nekih, ne svih pacijentica. Ima niz drugih rizičnih čimbenika za osteoporozu, kao što su: genetski, pušenje, duljina (trajanje) menopauze, slabija tjelesna aktivnost (sjedilački način života), slabiji (dijetalni) unos minerala i vitamina. Razlike u riziku za prijelom između različitih etničkih skupina ne mogu se objasniti samo razlikama u mineralnoj gustoći kosti, na učestalost osteoporoze među različitim etničkim skupinama utječu i drugi rizični čimbenici. U nekih pacijentica s hipertireozom malo je viši rizik gubitka koštane mase, a u drugim studijama primjena hormona štitnjače nije udružena s povećanim rizikom od prijeloma kuka (ne govori se o prekomjernoj primjeni) (318).



Usprkos mnogim studijama, postoje neslaganje o učinku hormona štitnjače na skeletni sustav. Greenspan i sur. su pokazali da hipertireoza, endogena ili egzogena supresija TSH (karcinom štitnjače, Basedovljeva bolest ili toksični adenom) imaju učinak na koštanu masu, osobito postmenopauzalnih žena, najveći učinak na kortikalnu kost (DXA kuka i podlaktice). (265). Supstitucijska terapija hormonima štitnjače ima minimalni učinak na kost ! Velike epidemiološke studije, na 23.183 bolesnika, utjecaja nadomjesne terapije levotiroksinom na prijelom vrata bedrene kosti u žena, kao neovisnog čimbenika rizika, nisu potvrđene (319). Neke studije u mlađih pacijenata s karcinomom štitnjače i tireosupresivnom terapijom ne nalaze povećanog rizika za gubitak koštane mase i nastanak prijeloma kralježaka, ali koštana masa raste cikličkom primjenom pamidronata (320, 321). Također nekoliko drugih studija ne nalaze korelaciju između suprimiranog TSH (hipertireoza) i povećanog rizika gubitka koštane mase u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (322). Još je manje za očekivati povećani rizik u granično niskim TSH (borderline low TSH), usprkos višegodišnjoj terapiji (2 godine) (323).

Čak isti autor u različitim studijama navodi različite podatke, najprije da nema korelacije 1997.g. (324), a potom 2001.g. da suprimirani TSH ima povećani rizik za prijelom kuka i kralježnice, dok normalna nadomjesna terapija nema povišenog rizika (282). Hipertireoza je neovisni rizični čimbenik za osteoporozu i prijelom u starijih bolesnica (282). Nadomjesna terapija hormonima štitnjače uz uredne vrijednosti TSH nije povećani rizik, što nas upozorava na važnost monitoriranja TSH. Nije bilo razlike u gustoći kosti muškaraca i premenopauzalnih žena, dok za postmenopauzalne žene postoje različiti rezultati. U premenopauzalnih bolesnica s tireotoksikozom (hipertireoza) dolazi do ubrzanja pregradnje i smanjenja mineralne gustoće kosti, a 39 mjeseci nakon početka tireostatske terapije pacijentice još nisu oporavile mineralnu gustoću kosti (325). Povećana supstitucija ili tireosupresivna terapija jedino je opravdana u bolesnica s karcinomom štitnjače, iako je rizik osteoporoze nakon dugotrajne tireosupresivne terapije povećan. (326).

Ipak, analiza razine serumskog TSH i mineralne gustoće kosti u NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) studiji, nakon prilagodbe prema dobi, rasi, BMI, T4, HNL, pušenju i tjelesnoj aktivnosti pokazala je povezanost normalnih razina TSH i mineralne gustoće kosti u postmenopauzalnih američkih žena (327). Alternativno, TSH može imati ulogu u čuvanju kosti postmenopauzalnih žena! Također se potvrđuje učinak FSH na koštanu masu u postmenopauzalnih žena, što sve ukazuje da je gustoća kosti kontrolirana od strane mozga, neuronskim putem hipotalamusa i neurohumoralnim putem hipofize (317).

Praktična primjena navedenih rezultata u kliničkoj praksi je postavljanje cut-off vrijednosti serumskog TSH kada je potrebno primijeniti bisfosfonate u prevenciji prijeloma u bolesnica s hipertireozom, odnosno postavljanje subkliničke hipertireoze (nisko-normalne vrijednosti TSH) kao rizičnog čimbenika za osteoporozu odnosno pitanje prevencije gubitka koštane mase !!

### **6.3. Uloga endogenog TSH**

Vrlo je malo kliničkih istraživanja o djelovanju promjena endogenog TSH na koštanu pregradnju. Studije pokazuju da TSH izravno inhibira pregradnju kosti djelujući na koštanu izgradnju i razgradnju, što ukazuje da suprimirani TSH, a ne hormoni štitnjače u tireotoksikozi uzrokuju gubitak koštane mase. Nasuprot navedenim rezultatima, Murphy i Williams su upotrebom testa ispitivanja rezistencije na hormone štitnjače (kombinacija T3 i TRH) pokazali da na koštanu pregradnju u muškaraca prije utječe T3 nego TSH (328). Hormoni štitnjače u djece stimuliraju stvaranje kosti i linearni rast, paradoksnno tireotoksikoza uzrokuje smanjeni rast i kraniosinostozu zbog ranijih zatvaranja epifiznih pukotina i sutura lubanje. U odraslih hormoni štitnjače ubrzavaju pregradnju kosti što uzrokuje progresivni gubitak koštane mase i osteoporozu. Rezultati istraživanja upućuju da hormoni štitnjače stimuliraju diferencijaciju osteoblasta, ubrzavaju koštanu pregradnju, ali inhibiraju mineralizaciju zrelih osteoblasta u odraslih (329). Stimulirajuća protutijela na TSH-R (TSHRAb) u Basedowljevoj bolesti bi trebala inhibirati pregradnju kosti, no nalazi se visoka pregradnja s povećanim rizikom od prijeloma. TSH receptori su nađeni na ljudskim i mišjim osteoblastima i osteoklastima. TSH- $\alpha$  se nalaze samo na humanim osteoblastima, a TSH- $\beta$  nisu nađena u svim stanicama. Iako osteoblasti i osteoklasti imaju TSH-R mRNA, samo osteoklasti odgovaraju na TSH (330). Nije se našlo parakrine kontrole TSH in vivo, učinak nastaje od cirkulirajućeg TSH, iako se ne može isključiti aktivacija TSH-R u ljudskom skeletu lokalno stvorenim tirostimulinom (lokalni TSH-R agonist visokog afiniteta).

Za istraživanje mogućeg učinka izrazitog porasta trajno suprimiranih vrijednosti endogenog TSH (subklinička hipertireoza) (protokol C1) ili naglog sniženja vrlo visokih vrijednosti TSH (protokol C2) korištene su kontrole u većini postmenopausalnih pacijentica s karcinomom štitnjače. Nedostatak protokola istraživanja je nemogućnost apsolutnog

isključenja utjecaja peroralno primjenjenih hormona štitnjače u svrhu tireosupresivne terapije na koštanu pregradnju. Dobre strane protokola su mogućnost kliničkog ispitivanja u pacijentica koje su na redovitim postoperativnim kontrolama, te vrlo velike i nagle promjene endogenog TSH, od 93 do 8.000 puta u odnosu na početnu vrijednost.

U pacijentica na tireosupresivnoj terapiji već bazalno se nalaze više vrijednosti biljega koštane razgradnje (CTXs) i tek 7. dan testa pokazuje se tendencija smanjenja, koja je u korelaciji s porastom TSH. Akceleracija inhibicije koštane razgradnje nastavlja se i nakon uvođenja u terapiju LT4 (28. dan) i smanjenja TSH (42. dan) što moguće govori o sporosti regulatornih receptorskih mehanizama na osteoblastima i osteoklastima. Usprkos smanjenju CTXs u svih ispitanica, promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ), čak i kod supresije od 45%, vj. zbog malog broja ispitanica (6), jer je standardna pogreška u svih gotovo ista (0,08). CTXs pokazuje 2,75 puta veće početne prosječne vrijednosti kod suprimiranog endogenog TSH (protokol C1) nego kada je endogeni TSH visok (protokolu C2), što potvrđuje naše rezultate da su niski i nisko normalni TSH rizični čimbenik za osteoporozu, odnosno da je tireosupresivna terapija povezana s većom pojavom osteoporoze u tih žena.

Slično kao i CTXs, biljeg koštane izgradnje u serumu, OC pokazuje značajno veće prosječne početne vrijednosti kod suprimiranog endogenog TSH, nego kod visokih vrijednosti TSH u protokolu (2,39 puta), vj. kao posljedica suprimiranih TSH vrijednosti. Iako je supresija OC u postocima slična smanjenju CTXs, ovdje nalazimo statistički graničnu supresiju 28. dan testa u odnosu na početne vrijednosti. Značajan porast suprimiranog endogenog TSH dovodi do supresije normalnih vrijednosti biljega koštane izgradnje ispod donjih granica normale.

Svrha protokola C2 bila je utvrditi da li je potisnuta koštana pregradnja visokim vrijednostima TSH podložna brzom oporavku nakon naglog smanjenja endogenog lučenja (supresije) TSH uvođenjem supstitucije levotiroksinom. Bilo je potrebno izvjesno vrijeme, oko 10-tak dana, za reakciju hipofize na periferne hormone štitnjače i smanjenje serumske TSH vrijednosti. U prvih 7 dana nije bilo značajnijeg porasta, a potom značajnijim smanjenjem endogenog TSH dolazi do porasta CTX za oko 70%, što potvrđuje djelovanje TSH na koštanu pregradnju. Usprkos visokom prosječnom porastu, promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ), iako se porast biljega koštane razgradnje nalazi u svih ispitanica, od 8% do 1100%, vj. opet kao posljedica premalenog broja ispitanica (5). Porast OC je statistički značajan 14. dana testa u odnosu na početne vrijednosti, odnosno postepeno smanjenje visokog endogenog TSH u serumu dovodi do porasta

suprimirane izgradnje kosti. To je u suprotnosti s našim pretkliničkim studijama u kojima smo dokazali da jednokratna dnevna primjena malih doza egzogenog TSH bitno potiče stvaranje kosti, a suprimira aktivnost osteoklasta. Slično tome u kliničkoj praksi dugotrajno povećanje endogenog paratireoidnog hormona dovodi do brze razgradnje kosti zbog povećanog učinka na koštanu razgradnju u odnosu na povećano stvaranje kosti što u konačnici uzrokuje brzi gubitak koštane mase. Slično kao i u TSH jednokratna, ciklička primjena PTH uzrokuje značajno povećanje koštane mase zbog pozitivnog učinka na osteoblaste i smanjenog poticanja osteoklasta. To su razlozi prema kojima očekujemo da bi ciklička primjena egzogenog TSH u malim dozama mogla biti terapijski učinkovita u liječenju osteoporoze, ako ne bi mijenjala koncentraciju perifernih hormona štitnjače! Čini se da je razgradnja kosti potisnuta više od koštane izgradnje na temelju rezultata određivanja koštanih biljega u serumu tijekom ovog ispitivanja. Time smo potvrdili istraživanja Abe i sur. koji su na temelju izbačenog gena za TSH-R zaključili da endogeni TSH djeluje kao negativni regulator koštane pregradnje potiskujući aktivnost osteoklasta i osteoblasta.

Vrijednosti ukupnih i slobodnih hormona štitnjače su u korelaciji, kao i s promjenama TSH vrijednosti. Naime isključenjem tireosupresivne terapije koncentracija hormona štitnjače postaje nemjerljiva, a TSH izrazito raste tako da možemo pratiti njegov učinak na pregradnju kosti. Zanimljivo da se vrijednosti BAP, 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH, Ca/s i P/s u oba protokola nisu značajnije mijenjala.

Supresijom TSH postiže se terapijska korist, no nema prospektivnih studija koje su potvrdile optimalnu, supresivnu razinu TSH. Razumni cilj je postići supresiju TSH, bez kliničke slike hipertireoze s komplikacijama kao što su fibrilacija atrijska, osteopenija, anksioznost ili drugi simptomi tireotoksikoze. Za pacijente s niskim rizikom recidiva ciljna terapija supresije TSH bi iznosila 0,1 do 0,5 mIU/L. Za one s visokim rizikom, ili poznatim metastazama, indicirana je potpuna supresija TSH do blage tireotoksikoze. U takvim slučajevima kontrola FT4 osigurava od prekomjerne supresije (26).

Učinak jednokratne stimulacije endogenog TSH pomoću TRH testa na hormone štitnjače, CTXs, OC i druge metaboličke parametre u pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom opisan je u protokolu C3. Iako vrlo blago, postignuta je dugotrajnija supresija CTXs nakon jednokratne primjene TRH tj. kratkotrajne endogene stimulacije TSH, dok je OC praktično ostao nepromijenjen. Nije bilo supresije koštane izgradnje čime bio se mogao objasniti povoljan učinak jednokratnog pulsog davanja egzogenog TSH. Ponavljanim pulsним davanjem egzogenog TSH moguće bi se postigla jača supresija koštana razgradnje,

bez supresije koštane izgradnje čime bi se postigao terapijski učinak, za što su potrebna daljnja istraživanja. Neočekivano je došlo do porasta serumske vrijednosti kalcija tijekom 14 dana nakon endogene stimulacije s TSH, bez statistički značajne promjene u koštanim biljezima pregradnje stoga, stoga ova promjena nema kliničkog objašnjenja.

Nekoliko je razina dokaza koji potvrđuju da je uloga receptora za TSH ključna u održavanju skeletne homeostaze u ljudi i da TSH izravno regulira pregradnju skeleta (331). TSH djeluje supresivno na osteoblaste i osteoklaste, a diferencijaciju i sazrijevanje njihovih prekursora potiče nedostatak receptora za TSH. Suprotno tome, hormon štitnjače djeluju izravno samo na osteoblaste, dok TSH smanjuje djelovanje i osteoblasta i osteoklasta različitim neovisnim mehanizmima. Gubitak mogućnosti djelovanja TSH (TSH-R<sup>-/-</sup> miševi) dovodi do ubrzane razgradnje kosti, koja nadmašuje izgradnju, s posljedičnim razvojem osteoporoze. Obzirom na sve, otkriće o važnoj ulozi TSH u koštanom metabolizmu nije tako ni iznenađujuće obzirom da TSH djeluje na mnoge ključne medijatore funkcije koštanih stanica !! Navedene spoznaje zahtjevaju ne samo revidiranje osnovnih mehanizama regulacije pregradnje kosti, već i postavljanje osnove patofiziologije tireoidne osteopatije.

Uloga hipotalamusa u kvaliteti koštane mase postaje sve značajnija, a izravni i posredni učinci hormona prednjeg režnja hipofize, TSH i FSH, na koštanju pregradnju već su opisani (272, 169). S druge strane poznata je i neurološka regulacija koštane mase intermitentno putem simpatičkog nervnog sustava s promjenama stimulacijskih frekvencija što uključuje mozak putem neuralnog i humoralnog sustava kao ključan regulator koštane pregradnje odnosno kvalitete kosti (332).

Moguće je da TSH i njegov receptor budu ciljne molekule specifičnih lijekova za kost. Prvi dokaz učinka rekombinantnog TSH izravno na kost u postmenopausalnih žena postignut je jednokratnom dozom koja uzrokuje smanjenje serumskog cross lapsa, biljega koštane razgradnje, tijekom slijedeća 2 dana (284).

## 7. ZAKLJUČCI

Potvrdom TSH-R na prekursorima osteoklasta i osteoblasta te dokazima izravnog negativnog učinka TSH na pregradnju kosti, neovisno o vrijednostima hormona štitnjače, TSH postaje važan regulator tih procesa. Nove spoznaje višestruko mogu koristiti humanoj medicini. Prema rezultatima ovog istraživanja možemo zaključiti:

1. Niske doze humanog TSH (0.7 i 7  $\mu$ g), su učinkovitije za očuvanje kosti nakon ovarijektomije u štakora, osobito u stražnjih udova.
2. Nije bilo značajnih razlika u TT niti nuspojava između pokusnih skupina. Humani TSH u modelu prevencije gubitka kosti, bitno utječe na sprječavanje gubitka koštane mase mehanizmom koje potiče stvaranje, a sprječava razgradnju kosti na način da ne mijenja koncentraciju hormona štitnjače stoga bi se mogao koristiti u prevenciji gubitka kosti.
3. Epidemiološkim istraživanjem nalazimo značajno veću učestalost osteoporoze u kralježnici (88%), nego u vratu bedrene kosti (51,5%).
4. U populaciji postmenopauzalnih žena s osteoporozom 8,8% je imalo hipertireozu i značajno slabiju gustoću kosti, a svega 3,3% je imalo hipotireozu i bolju kost.
5. Nije utvrđena statistički značajna razlika u mineralnoj gustoći kosti kralježnice i vrata bedrene kosti u odnosu na različite skupine TSH vrijednosti, niti u različitim dobnim skupinama, no veoma je izraženo grupiranje pacijentica s postmenopauzalnom osteoporozom u područje niskih i nisko normalnih vrijednosti TSH. U donjoj  $\frac{1}{4}$  TSH vrijednosti bilo je  $\frac{3}{4}$  pacijentica s osteoporozom, dok je u gornje  $\frac{3}{4}$  TSH vrijednosti bila svega  $\frac{1}{4}$ . Čak 83,6% pacijentica s osteoporozom imale su TSH manje od 2 mIU/L.
6. Vrlo slične rezultate, graničnu značajnost, nalazimo u učestalosti osteoporotičnih prijeloma u žena s postmenopauzalnom osteoporozom, od kojih je 85,4% imalo osteoporotični prijelom s nisko normalnom vrijednosti TSH (0,3-2,0 mIU/L).
7. Osteoporotični prijelomi su bili značajno češći u grudnoj (76%) nego u slabinskoj kralježnici (4,4%), stoga bi u radiološkoj dijagnostici trebalo više cijeniti tu činjenicu.
8. Visoki postotak učestalosti u skupini niskih TSH vrijednosti bez statističke značajnosti tumačimo prethodnim selekcioniranjem postmenopauzalnih žena s niskom mineralnom gustoćom kosti kod kojih nije moguće statistički dokazati razliku koja je deskriptivno vrlo jasna, a ekstrapolacija rezultata nije moguća.

9. TSH u skupini pacijentica s dokazanom osteoporozom nije prediktor nastanka prijeloma kralježka. TSH je prediktor samo u ukupnoj postmenopauzalnoj populaciji žena.
10. Praktična primjena rezultata istraživanja u kliničkoj praksi je postavljanje cut-off vrijednosti serumskog TSH ( $<2,0$  mIU/L) kada postoji visoki rizik osteoporoze i osteoporotičnog prijeloma. Odnosno postavljanje nisko normalnog TSH kao rizični čimbenik za osteoporozu odnosno pitanje prevencije gubitka koštane mase. Postavlja se pitanje revizije donje granice normale TSH, bar u visoko rizičnoj populaciji.
11. Nedostatak protokola s endogenim TSH je nemogućnost apsolutnog isključenja utjecaja p.o. primjenjenih hormona štitnjače u svrhu tireosupresivne terapije ! Prednosti su u mogućnosti kliničkog ispitivanja učinka vrlo velikih (do 8.000 puta) i naglih promjena endogenog TSH na koštanu pregradnju.
12. U pacijentica na tireosupresivnoj terapiji već bazalno se nalaze više vrijednosti CTXs i OC (2,75 i 2,39 puta) u odnosu na pacijentice s visokim TSH vrijednostima. Razgradnja kosti je potisnuta više od koštane izgradnje prema pokazateljima pregradnje kosti.
13. Usprkos smanjenju CTXs u svih ispitanica, promjene nisu bile statistički značajne, čak i kod supresije od 45%, vj. zbog malog broja ispitanica.
14. Značajan porast suprimiranog endogenog TSH dovodi do supresije normalnih vrijednosti biljega koštane izgradnje ispod donjih granica normale, a značajnije smanjenje visokog endogenog TSH dovodi do porasta CTXs za oko 70%, što potvrđuje djelovanje TSH kao negativnog regulatora koštane pregradnje.
15. Očekujemo da bi ciklička primjena egzogenog TSH u malim dozama mogla biti terapijski učinkovita u liječenju postmenopauzalne osteoporoze, ako ne bi mijenjala koncentraciju hormona štitnjače.
16. Razumni cilj je postići supresiju TSH, bez kliničke slike hipertireoze. Za pacijente s niskim rizikom recidiva karcinoma štitnjače ciljna supresija TSH bi iznosila 0,1 do 0,5 mIU/L. Za one s visokim rizikom, ili poznatim metastazama, indicirana je potpuna supresija TSH do blage tireotoksikoze.
17. Iako vrlo blago, statistički nesigurno, postignuta je dugotrajnija supresija CTXs nakon jednokratne i kratkotrajne endogene stimulacije TSH, dok je OC praktično ostao nepromijenjen. Ponavljanim pulsanim davanjem egzogenog TSH moguće bi se postigla jača supresija koštane razgradnje, bez supresije koštane izgradnje čime bi se postigao terapijski učinak.
18. Uloga TSH i njegovih receptora u pregradnji skeleta postavlja ih u središte pažnje kao mogućih budućih lijekova.

## 8. SAŽETAK

Tireotropin (TSH) je hormon prednjeg režnja hipofize čija je glavna funkcija povećanje volumena, broja te sekrecijske djelatnosti stanica štitnjače. U nedavnim istraživanjima pokazano je da tireotropin ima inhibitorno djelovanje na pregradnju kosti. TSH neposredno djeluje na stvaranje i razgradnju kosti putem TSH receptora (TSH-R) nađenih na prekursorima osteoblasta i osteoklasta. Već 50% smanjenje izraženosti TSH-R izaziva osteoporozu i fokalnu sklerozu ukazujući da je TSH neovisna molekula u kontroli koštane pregradnje. U disertaciji je istražena učinkovitost i mehanizam djelovanja TSH na kost u štakorskom modelu osteoporoze i u postmenopauzalnih žena s različitim vrijednostima endogenog TSH. Zbog učinka TSH na izlučivanje hormona štitne žljezde, bitno je utvrditi postoji li koncentracija TSH koja učinkovito potiče stvaranje kosti, a da ne utječe na pojačano izlučivanje hormona štitne žljezde zbog posljedične hipertireoze.

Niske doze humanog TSH (0.7 i 7  $\mu$ g), su učinkovitije za očuvanje kosti nakon ovarijektomije, osobito u stražnjih udova. Nakon 8 tjedana terapije BMD je na svim mjerenim područjima bio značajno povećan u životinja koje su dobivale 0.7  $\mu$ g humanog TSH u odnosu na OVX štakore. *Ex vivo* DXA mjerenja su pokazala da je BMD proksimalnog vrata bedrene kosti dostigao SHAM vrijednosti u životinja koje su dobivale 0.7 i 7  $\mu$ g humanog TSH. Pretklinički rezultati su potvrdili da minimalne količine egzogenog TSH ne utječu na hormone štitnjače, a neposredno povećavaju koštanu masu u štakora, TSH će postati nova mogućnost liječenja bolesnika sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti. Tu mogućnost dodatno ćemo potvrditi ukoliko dokažemo da povećanje i smanjenje serumskih vrijednosti endogenog TSH utječe na biljege koštane pregradnje u ljudi.

Epidemiološka istraživanja pokazuju da je niski TSH rizični čimbenik za osteoporozu, no rezultati ukazuju da je i kod nisko normalnih vrijednosti TSH značajno veća učestalost osteoporoze (3 puta). U postmenopauzalnih žena s osteoporozom značajno su češći osteoporotični prijelomi u području nisko normalnih TSH vrijednosti, a učestalost prijeloma je značajno češća u području grudne u odnosu na slabinski dio kralježnice. Praktična primjena epidemioloških rezultata u kliničkoj praksi je postavljanje cut-off vrijednosti serumskog TSH koje predstavlja rizični čimbenik gubitka koštane mase. Prema našim rezultatima svim postmenopauzalnim ženama sa serumskom vrijednosti TSH manje od 2,0 mIU/L potrebno je napraviti obradu u smislu osteoporoze jer je visoki rizik potvrde osteoporoze i osteoporotičnog prijeloma. Navedeni rezultati potvrđuju pretklinička istraživanja koja upućuju da je TSH negativan regulator koštane pregradnje.



Istraživali smo utjecaj vrlo visokih i vrlo niskih vrijednosti endogenog TSH na serumske biljege koštane pregradnje u bolesnika u kojih je izvršena tireoidektomija radi diferenciranog karcinoma štitnjače. Prema našim rezultatima suprimirani endogeni TSH dovodi do jače koštane razgradnje, a učinak supresije visokim endogenim TSH značajniji je što su početne vrijednosti CTX niže. Odnosno višestruki porast endogenog TSH djeluje kao negativni regulator koštane pregradnje, a njegovo sniženje dovodi do povećanja koštane pregradnje. Usprkos smanjenju CTXs u svih ispitanica, promjene CTXs nisu bile statistički značajne u odnosu na početne vrijednosti ( $P > 0,05$ ), čak i kod supresije od 45% vj. zbog malog broja ispitanica. Supresija OC je slična smanjenju CTXs, statistički granična supresija 28. dan testa ( $P = 0,056$ ). Značajan porast suprimiranog endogenog TSH dovodi do supresije normalnih vrijednosti biljega koštane izgradnje (OC) ispod donjih granica normale. Zbog navedenih rezultata potrebno je učiniti dodatna istraživanja.

Analizirane su akutne promjene koštanih biljega i hormona štitnjače jednokratnom stimulacijom TSH pomoću TRH testa u postmenopauzalnih žena. Iako vrlo blago, postignuta je dugotrajnija supresija biljega koštane razgradnje u serumu (CTXs) nakon jednokratne primjene TRH tj. kratkotrajne endogene stimulacije TSH, dok je biljeg koštane izgradnje (OC) praktično ostao nepromijenjen, vrlo mali, statistički nesignifikantan porast. Nije bilo supresije koštane izgradnje čime bio se mogao objasniti povoljan učinak jednokratnog pulsog davanja egzogenog TSH. Ponavljanim pulsним davanjem egzogenog TSH u većim dozama od endogene stimulacije moguće bi se postigla jača supresija koštana razgradnje, bez supresije koštane izgradnje čime bi se postigao terapijski učinak, za što su potrebna daljnja istraživanja.

Za razliku od ranijih shvaćanja, kost je vrlo dinamičan organ čija cjelovitost strukture ovisi o stalnoj pregradnji, reguliranoj mnogim lokalnim i sistemskim čimbenicima. Hormon koji stimulira štitnjaču (TSH) je važan regulator tih procesa. Visoki TSH smanjuje, a niski TSH ubrzava koštanu pregradnju s posljedičnim poremećajem koštane gustoće.

Hrv: TSH, koštani markeri, koštana pregradnja, BMD

## 9. SUMMARY

Thyroid stimulating hormone (TSH) is an anterior pituitary gland hormone whose established function is to promote thyroid follicle development and hormone secretion. It has been recently shown that thyrotropin has an inhibitory activity on skeletal remodelling. TSH directly affects both components of skeletal remodelling; bone formation and resorption, mediated via the TSH receptor (TSH-R) found on osteoblast and osteoclast precursors. Even a 50% reduction in TSH-R expression produces profound osteoporosis together with focal osteosclerosis, thus implicating TSH as a single necessary molecular switch that negatively regulates both components of skeletal remodelling. In this research we investigated the mechanism and the efficiency of TSH in a rat model and in postmenopausal patients of osteoporosis with variable endogenous TSH serum values. As TSH affects thyroid gland hormone secretion, it is crucial to determine whether there is a concentration of TSH that induces bone formation, but does not induce hyperthyroidism with high bone turnover markers.

Low human TSH doses (0.7 and 7  $\mu\text{g}$ ) are more efficient for bone preserving after being exposed to ovariectomy, particularly with back limbs. Upon taking 8 weeks long therapy, in all observed areas BMD resulted significantly increased with animals given 0.7  $\mu\text{g}$  of human TSH as opposed to OVX rats. *Ex vivo* DXA measurements showed that BMD of femur proximal neck reached SHAM values with animals given 0.7 and 7  $\mu\text{g}$  of human TSH. Preclinical results confirmed minimal exogenous TSH quantities not to affect thyroid hormones while they directly increase rats' bone mass. TSH could become a new possible therapy for patients with low bone mineral density. This hypothesis can be additionally confirmed if we prove that variations of the endogenous TSH affect serum bone remodelling markers with humans.

Epidemiological research show low TSH to be a risky factor for osteoporosis, though the result also shows significantly higher osteoporosis incidence (three times) even with low normal TSH values. Postmenopausal women with osteoporosis have significantly more frequent osteoporotic fractures in the area of low normal TSH value, while the fracture frequency is more common in the area of thorax than lumbar spine. Practical implementation of epidemiological results in clinical practice is the setting of serum TSH cut-off value which represents a risk factor of bone mass loss. Pursuant to our results, all postmenopausal women with TSH serum value smaller than 2,0 mIU/L need to be evaluated for osteoporosis due to a high risk of confirming osteoporosis and osteoporotic fractures. Preclinical researches are

confirmed by the aforementioned results thus pointing TSH to be negative bone remodelling regulator.

We evaluated the sequential profile of serum bone markers during endogenous stimulation of TSH in thyroidectomized women monitored for thyroid carcinoma. Based on our results, suppressed endogenous TSH results in increased bone resorption; the lower the initial CTX values are, the more significant is the effect of suppression through high endogenous TSH. In other words, multiple endogenous TSH increase acts as a negative bone remodelling regulator, while its decrease results in increased bone remodelling. Despite decreased CTXs with all female subjects, CTXs changes were not statistically significant in relation to the initial values ( $P>0.05$ ), not even with 45% suppression, very likely due to a small number of the female subjects. OC suppression is similar to CTXs decrease, statistically marginal suppression on the 28<sup>th</sup> day of the test ( $P=0,056$ ). Significant increase of suppressed endogenous TSH results in suppressed normal values of bone formation markers (OC) below lower normal margins. Additional researches need to be made due to the aforementioned results.

Acute changes of bone markers and thyroid hormones were analysed by a single TSH stimulation through TRH test with postmenopausal women. Although very mild, long-term suppression of bone resorption marker in the serum (CTXs) was reached after single TRH application, i.e. short-term TSH endogenous stimulation, while the bone formation marker (OC) remained rather unchanged, very minor, statistically insignificant increase. There was no bone formation suppression what could account for the favourable effect of single pulse exogenous TSH administration. Repeated pulse exogenous TSH administration in doses higher than the endogenous stimulation could result in stronger bone resorption suppression, without bone formation suppression what could have a therapeutic effect. However, this requires further researches.

As opposed to earlier beliefs, bone is a dynamic organ whose structure integrity depends on constant remodelling, regulated by numerous local and system factors. Thyroid stimulating hormone (TSH) is an important regulator of the aforementioned processes. High TSH decreases while low TSH accelerates bone remodelling resulting in bone density imbalance.

Eng: TSH, bone markers, bone remodelling, BMD

## 10. LITERATURA

---

1. Sawin CT, Geller A, Hershman JM, Castelli W, Bacharach P. The Aging thyroid. The use of thyroid hormone in older persons. *JAMA*, 1989; 261:2653-5.
2. Melton LJ 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL. Perspective. How many women have osteoporosis ? *J Bone Miner Res* 1992; 7:1005-10.
3. Giljević Z. Utjecaj hormona hipofize i štitnjače na koštanu masu. Knjiga sažetaka: IV Hrvatski kongres o osteoporozi, Dubrovnik, 2007, str. 52.
4. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochemistry* 1981; 50:465-95.
5. Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocrine Reviews* 1990; 11:354-85.
6. Melmed S, Jameson JL. Thyroid stimulating hormone. u *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition*, urednici Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher JK, izdavač McGraw-Hill Professional, New York, 2005; str. 2096.
7. Pierce JG. The Subunits of Pituitary Thyrotropin. Their Relationship to other Glycoprotein Hormones. *Endocrinology* 1971; 89:1331-44.
8. Reese-Smith B, Pyle GA, Petersen VB, Hall R. Interaction of Thyrotropin with the Human Thyrotropin Receptor. *J Endocrinol* 1977; 75:391-400.
9. Sterling K, Lazarus JH. The Thyroid and Its Control. *Annu Rev Physiol* 1977; 39:349-71.
10. Patel YC, Alford FP, Burger HG. The 24-Hour Plasma Thyrotropin Profile. *Clin Sci* 1972; 43:71-7.
11. Morley JE. Neuroendocrine Control of Thyrotropin Secretion. *Endocr Rev* 1981; 2:396-436.
12. Burger HG, Patel YC. The Value of Serum Thyrotropin Measurement in the Diagnosis and Management of Hypothyroidism. *Med J Aust* 1972; 2:293-7.
13. Petersen VB, McGregor AM, Belchetz PE, Elkeles RS, Hall R. The Secretion of Thyrotrophin with Impaired Biological Activity in Patients with Hypothalamic-Pituitary Disease. *Clin Endocrinol* 1978; 8:397-402.
14. Faglia G, Bitensky L, Pinchera H, Ferrari C, Paracchi A, Beck-Peccoz P et al. Thyrotropin Secretion in Patients with Central Hypothyroidism: Evidence for Reduced Biological Activity of Immunoreactive Thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:989-98.
15. Beck-Peccoz P, Amr S, Menezes-Ferreira MM, Faglia G, Weintraub BD. Decreased Receptor Binding of Biologically Inactive Thyrotropin in Central Hypothyroidism. *N Engl J Med* 1985; 312:1085-90.
16. Kourides IA, Ridgway EC, Weintraub BD, Bigos ST, Gershengorn MC, Maloof F. Thyrotropin-Induced Hyperthyroidism: Use of Alpha and Beta Subunit Levels to Identify Patients with Pituitary Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45:534-43.
17. Weintraub BD, Gershengorn MC, Kourides IA, Fein H. Inappropriate Secretion of Thyroid Stimulating Hormone. *Ann Intern Med* 1981; 95:339-51.

18. Wehmann RE, Rubenstein HA, Pugeat MM, Nisula BC. Extended Clinical Utility of a Sensitive and Reliable Radioimmunoassay of Thyroid-Stimulating Hormone. *South Med J* 1983; 76:969-76.
19. Lauridsen UB, Deckert T, Friis TH, Kirkegaard C, Hansen JM, Siersbaek-Nielsen K. Estimation of Serum Thyrotropin (TSH) and Stimulation with Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in Thyroid Diseases. *Acta Med Scand* 1974; 196:171-6.
20. Jackson IMD. Thyrotropin-Releasing Hormone. *N Engl J Med* 1982; 306:145-55.
21. Spencer CA. Clinical Uses and Limitations of Rapid TSH Assays. *Medical Laboratory Products* 1988: 17-9.
22. Bayer MF. Performance Criteria for Appropriate Characterization of “(Highly) Sensitive” Thyrotropin Assays. *Clin Chem* 1987; 33:630-1.
23. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR, Spencer CA. American Thyroid Association Assessment of Current Free Thyroid Hormone and Thyrotropin Measurements and Guidelines for Future Clinical Assays. *Clin Chem* 1991; 37:2002-8.
24. Hay ID, Klee GG. Linking Medical Needs and Performance Goals: Clinical and Laboratory Perspectives on Thyroid Disease. *Clin Chem* 1993; 39:1519-24.
25. Jameson JL, Weetman AP. Thyroid hormone synthesis, metabolism and action. u *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition*, urednici Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher JK, izdavač McGraw-Hill Professional, New York, 2005; str. 2105-9.
26. Jameson JL, Weetman AP. Thyroid cancer. u *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition*, urednici Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher JK, izdavač McGraw-Hill Professional, New York, 2005; str. 2123-7.
27. Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94:646-50.
28. Browner WS, Pressman AR, Nevitt MC et al. Mortality following fractures in older women. The study of osteoporotic fractures. *Arch Intern Med* 1996; 156:1521.
29. WHO Study Group on Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. World Health Organization. Technical report series 843, Geneva, 1994, pp. 1-129.
30. Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1137-41.
31. Gambert SR, Schultz BM, Hamdy RC. Osteoporosis: clinical features, prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 1995; 24:317-71.
32. Khaltaev NG. Osteoporosis as a growing problem: WHO perspectives. *Scand J Rheumatol Suppl* 1996; 103:129–33.
33. WHO Technical Report Series 921. Prevention and management of osteoporosis. Report of a WHO scientific group. WHO, Geneva, 2003.
34. Melton LJ. How many women have osteoporosis now? *J Bone Min Res* 1995; 10:175-177.
35. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE et al. Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res* 2005; 20:185-.
36. Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE et al. Bone mineral density and the risk of incident nonspinal fractures in black and white women. *JAMA* 2005; 293:2102.

37. Finkelstein JS, Lee ML, Sowers M et al. Ethnic variation in bone density in premenopausal and early perimenopausal women: effects of anthropometric and lifestyle factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3057.
38. Melton LJ III. Epidemiology worldwide. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32:1-13.
39. Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC Jr et al. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1761-8.
40. Giljević Z. Značaj problema osteoporoze u Hrvatskoj. Zbornik: Simpozij o osteoporozi, Zagreb, 2005, 17.
41. Kralik M, Giljević Z, Kaštelan D, Čatić J, Kraljević I, Prutki M, Jelčić J. Epidemiološka studija osteoporoze u rizičnoj populaciji Hrvatske. Knjiga sažetaka: IV Hrvatski kongres o osteoporozi, Dubrovnik, 2007, str. 25.
42. McCloskey EV, Dey A, Parr RM et al. Global variations in peak bone mass as studied by dual-energy X-ray absorptiometry. *J Rad Nucl Chem* 2004; 259:341-5.
43. Cvijetić S, Grazio S, Kaštelan D, Koršić M. Epidemiologija osteoporoze u Hrvatskoj. *Liječ Vjesn* 2006; 128:261-4.
44. Cvijetić S, Koršić M. Apparent bone mineral density estimated from DXA in healthy men and women. *Osteoporos Int* 2004; 15:295-300.
45. 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; 29:221-5.
46. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115:3318.
47. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1531.
48. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354:2250.
49. Melton LJ III, Khosla S, Atkinson EJ et al. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1083.
50. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11:337.
51. Feik SA, Thomas CDL, Clement JG. Age-related changes in cortical porosity of the midshaft of the human femur. *J Anat* 1997; 191:407.
52. Chetkowski RJ, Meldrum DR, Steingold KA et al. Biologic effects of transdermal estradiol. *N Engl J Med* 1986; 314:1615.
53. Koršić M, Giljević Z. Osteoporoza. u *Interna medicina*, IV izdanje, urednici Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, Naklada Ljevak, Zagreb, 2008; 1445-50.
54. Parisien M, Silverberg SJ, Shane E et al. The histomorphometry of bone in primary hyperparathyroidism: preservation of cancellous bone structure. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:930.
55. Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand* 1978; 204:97.
56. Rigotti NA, Nussbaum SR, Herzog DB, Neer RM. Osteoporosis in women with anorexia nervosa. *N Engl J Med* 1984; 311:1601.

57. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R et al. Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1060.
58. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC et al. Bone mineral acquisition in healthy asian, hispanic, black and caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4702-12.
59. Recker RR, Davies KM, Hinders SM et al. Bone gain in young adult women. *Jama* 1992; 268:2403
60. Tenenhouse A, Joseph L, Kreiger N et al. Estimation of the prevalence of low bone density in Canadian women and men using a population-specific DXA reference standard: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Osteoporos Int* 2000; 11:897.
61. Lofman O, Larsson L, Toss G. Bone mineral density in diagnosis of osteoporosis: reference population, definition of peak bone mass, and measured site determine prevalence. *J Clin Densitom* 2000; 3:177.
62. Gilsanz V, Skaggs DL, Kovanlikaya A et al. Differential effect of race on the axial and appendicular skeletons of children. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1420-7.
63. Eastell R. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. U: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. The American Society for Bone and Mineral Research, 2003: 314-6.
64. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2460-6.
65. Gilsanz V, Gibbens DT, Carlsom M et al. Peak trabecular vertebral density: a comparison of adolescent and adult females. *Calcif Tissue Int* 1988; 43:260-2.
66. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B et al. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:555-63.
67. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL et al. A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: The University of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1672-9.
68. Brown MA, Houghton MA, Grant SF, Gunnell AS. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes. *J Bone Miner Res* 2001; 16:758.
69. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q et al. Relation of alleles of the collagen type Ia1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; 338:1016.
70. Kiel DP, Myers RH, Cupples LA et al. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1049.
71. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1841.
72. Shearman AM, Karasik D, Gruenthal KM et al. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2004; 19:773.
73. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004; 292:2105.

74. Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A et al. Linkage of Osteoporosis to Chromosome 20p12 and Association to BMP2. *PLoS Biol* 2003; 1:E69.
75. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 2002; 70:11.
76. Boyden LM, Mao J, Belsky J et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002; 346:1513.
77. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; 107:513.
78. Matković V, Kostial K, Simonovic I et al. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 1979; 32:540.
79. Bonjour JP, Carrie AL, Ferrari S et al. Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Invest* 1997; 99:1287.
80. Johnston CC Jr, Miller JZ, Slemenda CW et al. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N Engl J Med* 1992; 327:82.
81. Bonjour JP, Chevalley T, Ammann P et al. Gain in bone mineral mass in prepubertal girls 3.5 years after discontinuation of calcium supplementation: a follow-up study. *Lancet* 2001; 358:1208.
82. Lee WT, Leung SS, Leung DM, Cheng JC. A follow-up study on the effects of calcium-supplement withdrawal and puberty on bone acquisition of children. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:71.
83. Janz KF, Burns TL, Torner JC et al. Physical activity and bone measures in young children: The Iowa bone development study. *Pediatrics* 2001; 107:1387-93.
84. Puntila E, Kroger H, Lakke T et al. Physical activity in adolescence and bone density in peri- and postmenopausal women: a population based study. *Bone* 1997; 21:363-7.
85. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ et al. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991; 6:561-7.
86. Seeman E, Hopper JL, Bach LA et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989; 320:554-8.
87. Evans RA, Marel GH, Lancaster EK et al. Bone mass is low in relatives of osteoporotic patients. *Ann Intern Med* 1988; 109:870-3.
88. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1996; 11:150-9.
89. Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995; 10:466.
90. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R et al. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res* 1990; 5:311.
91. Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM et al. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest* 1994; 93:799.



92. Ravn P, Hetland ML, Overgaard K, Christiansen C. Premenopausal and postmenopausal changes in bone mineral density of the proximal femur measured by dual-energy X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1975.
93. Iki M, Morita A, Ikeda Y et al. Biochemical markers of bone turnover predict bone loss in perimenopausal women but not in postmenopausal women-the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporos Int* 2006; 17:1086.
94. Khosla S, Lufkin EG, Hodgson SF et al. Epidemiology and clinical features of osteoporosis in young individuals. *Bone* 1994; 15:551.
95. Reed BY, Zerwekh JE, Sakhaee K et al. Serum IGF 1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1218.
96. Rubin MR, Schussheim DH, Kulak CA et al. Idiopathic osteoporosis in premenopausal women. *Osteoporos Int* 2005; 16:526.
97. Donovan MA, Dempster D, Zhou H et al. Low bone formation in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3331.
98. Peris P, Guanabens N, Martinez de Osaba MJ et al. Clinical characteristics and etiologic factors of premenopausal osteoporosis in a group of Spanish women. *Semin Arthritis Rheum* 2002; 32:64.
99. Kalkwarf HJ, Specker BL. Bone mineral changes during pregnancy and lactation. *Endocrine* 2002; 17:49.
100. Sweeney AT, Blake M, Holick MF. Transient osteoporosis of hip in pregnancy. *J Clin Densitom* 2000; 3:291.
101. Promislow JH, Hertz-Picciotto I, Schramm M et al. Bed rest and other determinants of bone loss during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1077.
102. Laskey MA, Prentice A, Hanratty LA et al. Bone changes after 3 mo of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output, and vitamin D-receptor genotype. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:685.
103. Eisman J. Relevance of pregnancy and lactation to osteoporosis? *Lancet* 1998; 352:504.
104. Phillips AJ, Ostlere SJ, Smith R. Pregnancy-associated osteoporosis: does the skeleton recover?. *Osteoporos Int* 2000; 11:449.
105. VanHouten JN, Dann P, Stewart AF, Watson CJ. Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation. *J Clin Invest* 2003; 112:1429.
106. Cure-Cure C, Cure-Ramirez P, Teran E, Lopez-Jaramillo P. Bone-mass peak in multiparity and reduced risk of bone-fractures in menopause. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76:285.
107. Michaelsson K, Baron JA, Farahmand BY, Ljunghall S. Influence of parity and lactation on hip fracture risk. *Am J Epidemiol* 2001; 153:1166.
108. Shane E, Rivas M, Staron RB et al. Fracture after cardiac transplantation: a prospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1740.
109. Pfeilschifter J, Diel IJ. Osteoporosis due to cancer treatment: pathogenesis and management. *J Clin Oncol* 2000; 18:1570.
110. Halton JM, Atkinson SA, Fraher L et al. Altered mineral metabolism and bone mass in children during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1774.
111. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N et al. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20:152.

112. GoerSS JB, Kim CH, Atkinson EJ et al. Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 1992; 7:573.
113. Kim GS, Kim CH, Park JY et al. Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism* 1996; 45:1443.
114. Stone KL, Bauer DC, Sellmeyer D, Cummings SR. Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1217.
115. Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G et al. Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 2003; 33:956.
116. Mudd SH, Skovby F, Levy HL et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37:1.
117. Riggs BL, Melton LJ. Clinical heterogeneity of involutional osteoporosis: implications for preventive therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:1229.
118. Genant HK, Cann CE, Ettinger B, Gordan GS. Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. *Ann Intern Med* 1982; 97:699.
119. Ettinger B, Pressman A, Sklarin P et al. Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: the Study of Osteoporotic Fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2239.
120. Sowers MR, Jannausch M, McConnell D et al. Hormone predictors of bone mineral density changes during the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1261.
121. Heshmati HM, Khosla S, Robins SP et al. Role of low levels of endogenous estrogen in regulation of bone resorption in late postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2002; 17:172.
122. Prince RL, Smith M, Dick IM et al. Prevention of postmenopausal osteoporosis: a comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. *N Engl J Med* 1991; 325:1189.
123. Lindsay R, Hart DM, Clark DM. The minimum effective dose of estrogen for prevention of postmenopausal bone loss. *Obstet Gynecol* 1984; 63:759.
124. Emaus N, Berntsen GK, Joakimsen R, Fonnebo V. Longitudinal changes in forearm bone mineral density in women and men aged 45-84 years: the Tromso Study, a population-based study. *Am J Epidemiol* 2006; 163:441.
125. Eastell R. Osteoporosis. In: Wass JAH, Shalet SM (ed.) *Oxford Text Book of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2002, pp 656-75.
126. Riggs BL, Khosla S, Melton RJ III. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763-73.
127. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med* 1992; 327:1637.
128. Townsend MF, Sanders WH, Northway RO et al. Bone fractures associated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists used in the treatment of prostate carcinoma. *Cancer* 1997; 79:545.
129. Soule SG, Conway G, Prelevic GM et al. Osteopenia as a feature of the androgen insensitivity syndrome. *Clin Endocrinol* 1995; 43:671.

130. Behre HM, Kliesch S, Leifke E et al. Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2386.
131. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop* 1987; 215:260-71.
132. Macdonald HM, New SA, Campbell MK, Reid DM. Influence of weight and weight change on bone loss in perimenopausal and early postmenopausal Scottish women. *Osteoporos Int* 2005; 16:163.
133. Bainbridge KE, Sowers M, Lin X, Harlow SD. Risk factors for low bone mineral density and the 6-year rate of bone loss among premenopausal and perimenopausal women. *Osteoporos Int* 2004; 15:439.
134. Adami S, Giannini S, Giorgino R et al. Effect of age, weight and lifestyle factors on calcaneal quantitative ultrasound in premenopausal women: the ESOPO study. *Calcif Tissue Int* 2004; 74:317.
135. Uusi-Rasi K, Sievanen H, Pasanen M et al. Association of physical activity and calcium intake with the maintenance of bone mass in premenopausal women. *Osteoporos Int* 2002; 13:211.
136. Smjernice za dijagnostiku, prevenciju i liječenje osteoporoze (temeljene na EBM). IV Hrvatski konsenzus o osteoporozi. *Medix* 2007; 70:35-41.
137. Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM et al. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1987; 106:354-61.
138. Hergenroeder AC. Bone mineralization, hypothalamic amenorrhea, and sex steroid therapy in female adolescents and young adults. *J Pediatr* 1995; 126:683-9.
139. Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM. A longitudinal evaluation of bone mineral density in adult men with histories of delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1152-5.
140. LeBoff MS, Kohlmeier L, Hurwitz S et al. Occult vitamin D deficiency in postmenopausal US women with acute hip fracture. *JAMA* 1999; 281:1505.
141. Ryan P, Dixon T. Prevalence of vitamin D inadequacy in patients attending a metabolic bone clinic in Medway. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22:211-6.
142. Beringer T, Heyburn G, Finch M, McNally C, McQuilken M, Duncan M, Dixon T. Prevalence of vitamin D inadequacy in Belfast following fragility fracture. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22:101-5.
143. Simonelli C. The role of vitamin D deficiency in osteoporosis and fractures. *Minn Med.* 2005; 88(11):34-6.
144. Boonen S, Broos P, Verbeke G et al. Calcitropic hormones and markers of bone remodeling in age-related (type II) femoral neck osteoporosis: alterations consistent with secondary hyperparathyroidism-induced bone resorption. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; 52:M286.
145. Hoff AO, Catala-Lehnen P, Thomas PM, Priemel M. Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest* 2002; 110:1849.
146. Riggs BL, Melton LJ 3rd. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med.* 1986; 26;314(26):1676-86.
147. Nordin BEC, Need AG, Bridges A, Horowitz M. Relative contributions of years since menopause, age, and weight to vertebral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:20.
148. Cummings SR, Browner WS, Bauer D et al. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. *N Engl J Med* 1998; 339:733.

149. Prestwood KM, Pilbeam CC, Burlison JA et al. The short-term effects of conjugated estrogen on bone turnover in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:366.
150. Frank GR. The role of estrogen in pubertal skeletal physiology: Epiphyseal maturation and mineralization of the skeleton. *Acta Paediatr* 1995; 84:627-30.
151. Abu EO, Horner A, Kusec V et al. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3493-7.
152. Carani C, Qin K, Simoni M et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997; 337:91-5.
153. Smith EP, Boyd J, Frank GR et al. Estrogen resistance caused by a novel mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331:1056-61.
154. Anderson FH, Francis RM, Peaston RT, Wastell HJ. Androgen supplementation in eugonadal men with osteoporosis: effects of six months' treatment on markers of bone formation and resorption. *J Bone Miner Res* 1997; 12:472.
155. Raisz LG. Estrogen and bone: new pieces to the puzzle. *Nat Med* 1996; 2:1077.
156. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ et al. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000; 106:1553.
157. Eriksen RF, Langdahl B, Vesterby A et al. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1217.
158. Hughes DE, Dai A, Tiffiee JC et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996; 2:1132.
159. Bismar H, Diel I, Ziegler R, Pfeilschifter J. Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3351.
160. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP et al. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 1997; 99:1699.
161. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 2000; 106:1229.
162. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta at AP1 sites. *Science* 1997; 277:1508.
163. Nilsson LO, Boman A, Sävendahl L et al. Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:370.
164. Raisz LG, Wiita B, Artis A et al. Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:37.
165. Longcope C, Baker RS, Hui SL, Johnston CC Jr. Androgen and estrogen dynamics in women with vertebral crush fractures. *Maturitas* 1984; 6:309.
166. Prior JC, Vigna YM, Wark JD et al. Premenopausal ovariectomy-related bone loss: a randomized, double-blind, one-year trial of conjugated estrogen or medroxyprogesterone acetate. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1851.

167. Ishida Y, Bellows CG, Tertinegg I, Heersche JNM. Progesterone-mediated stimulation of osteoprogenitor proliferation and differentiation in cell populations derived from adult or fetal rat bone tissue depends on the serum component of the culture media. *Osteoporos Int* 1997; 7:323.
168. Perrien DS, Achenbach SJ, Bledsoe SE et al. Bone turnover across the menopause transition: correlations with inhibins and follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1848.
169. Sun L, Peng Y, Sharrow AC et al. FSH directly regulates bone mass. *Cell* 2006; 125:247.
170. Manolagas SC, Weinstein RS. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1061.
171. Reid IR, Heap SW. Determinants of vertebral mineral density in patients receiving long-term glucocorticoid therapy. *Arch Intern Med* 1990; 150:2545.
172. Ravn P, Overgaard K, Spencer EM, Christiansen C. Insulin-like growth factors I and II in healthy women with and without established osteoporosis. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:313.
173. Wuster C, Blum WF, Schlemilch S et al. Decreased serum levels of insulin-like growth factors and IGF binding protein 3 in osteoporosis. *J Intern Med* 1993; 234:249.
174. Boonen S, Aerssens J, Dequeker J et al. Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I - potential implications for age-related (type II) osteoporotic fracture occurrence. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:173.
175. Lorenzo JA, Sousa SL, van den Brink-Webb SE, Korn JH. Production of both interleukin-1 alpha and beta by newborn mouse calvarial cultures. *J Bone Miner Res* 1990; 5:77.
176. Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL et al. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology* 1995; 136:3054.
177. Lorenzo J, Naprta A, Rao Y et al. Mice deficient in the functional interleukin-1 receptor I (IL-1R1) do not lose bone mass after ovariectomy. *J Bone Miner Res* 1997; 12:S126.
178. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Vargas SJ et al. Ovariectomy enhances and estrogen replacement inhibits the activity of bone marrow factors that stimulate prostaglandin production in cultured mouse calvariae. *J Clin Invest* 1995; 96:539.
179. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M et al. Increase in cytokine production (IL-1-beta, IL-6, TNFalpha but not INF-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 1997; 26:63.
180. Sunyer T, Lewis J, Osdoby P. Estrogen decreases the steady-state levels of the IL-1 signaling receptor (Type I) while increasing those of the IL-1 decoy receptor (Type II) mRNAs in human osteoclast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997; 12:S135.
181. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993; 260:626.
182. Tai H, Miyaura C, Pilbeam CC et al. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology* 1997; 138:2372.
183. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 1995; 95:2886.

184. Miyaura C, Onoe Y, Inada M et al. Increased B-lymphopoiesis by interleukin-7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:9360.
185. Kawaguchi H, Nemoto K, Raisz LG et al. Interleukin-4 inhibits prostaglandin G/H synthase-2 and cytosolic phospholipase A2 induction in neonatal mouse parietal bone cultures. *J Bone Miner Res* 1996; 11:358.
186. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol* 1996; 156:758.
187. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313:36.
188. Thorsen K, Kristoffersson AO, Lerner UH, Lorentzon RP. In situ microdialysis in bone tissue — stimulation of prostaglandin E(2) release by weight-bearing mechanical loading. *J Clin Invest* 1996; 98:2446.
189. Feyen JH, Raisz LG. Prostaglandin production by calvariae from sham operated and oophorectomized rats: effect of 17-beta-estradiol in vivo. *Endocrinology* 1987; 121:819.
190. Thompson DD, Rodan GA. Indomethacin inhibition of tenotomy-induced bone resorption in rats. *J Bone Miner Res* 1988; 3:409.
191. Canalis E. Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone* 1997; 21:215.
192. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-b gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994; 15:27.
193. Finkelman RD, Bell NH, Strong DD et al. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: Implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:12190.
194. Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 1996; 132:195.
195. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997; 20:289.
196. Vukičević S, Stavljenić A, Pećina M. Discovery and clinical applications of bone morphogenic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33:661-71.
197. Martinović S, Borovečki F, Sampath KT, Vukičević S. Biology of bone morphogenetic proteins, u *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. ur. Vukičević S, Sampath KT. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; 87-119.
198. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest* 2005; 115:2402.
199. Hurley M, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream BE. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 1993; 268:5588.
200. Mayahara H, Ito T, Nagai H et al. In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. *Growth Factors* 1993; 9:73.

201. Reginster JL. Harmonization of clinical practice guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis and osteopenia in Europe: a difficult challenge. *Calcif Tissue Int* 1996; 59[Suppl 1]:S24–S29.
202. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004; 34(1):195–202.
203. Taylor BC, Schreiner PJ, Stone KL, Fink HA, Cummings SR, Nevitt MC, Bowman PJ, Ensrud KE. Long-term prediction of incident hip fracture risk in elderly white women: study of osteoporotic fractures. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52(9):1479–86.
204. Albrand G, Munoz F, Sornay-Rendu E, DuBoeuf F, Delmas PD. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy post-menopausal women: the OFELY study. *Bone* 2003; 32(1):78–85.
205. Leib ES, Lewiecki EM, Binkley N, Hamdy RC. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom* 2004; 7:1.
206. Kanis JA, Oden A, Johnell O et al. The burden of osteoporotic fractures: a method for setting intervention thresholds. *Osteoporos Int* 2001; 12:417.
207. Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL et al. Official positions of the International Society for Clinical Densitometry and Executive Summary of the 2005 Position Development Conference. *J Clin Densitom* 2006; 9:4.
208. Khaw KT, Reeve J, Luben R et al. Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. *Lancet* 2004; 363:197.
209. Stewart A, Reid DM. Quantitative ultrasound or clinical risk factors--which best identifies women at risk of osteoporosis?. *Br J Radiol* 2000; 73:165.
210. Watts NB. Bone quality: getting closer to a definition. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1148.
211. Mazess R, Chesnut CH, 3rd, McClung M, Genant H. Enhanced precision with dual-energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:14.
212. Njeh CF, Fuerst T, Hans D et al. Radiation exposure in bone mineral density assessment. *Appl Radiat Isot* 1999; 50:215.
213. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. *JAMA* 2001; 285: 785-95
214. Baddoura R, Awada H, Okais J, Salamoun M, Ayoub G, Ziadé N, El Hajj-Fuleihan G. An audit of bone densitometry practice with reference to ISCD, IOF and NOF guidelines. *Osteoporos Int* (2006) 17:1111–5.
215. Lenchik L, Kiebzak GM, Blunt BA. What is the role of serial bone mineral density measurements in patient management?. *J Clin Densitom* 2002; 5 Suppl:S29.
216. Bonnick SL, Johnston CC Jr, Kleerekoper M et al. Importance of precision in bone density measurements. *J Clin Densitom* 2001; 4:105.
217. Nguyen TV, Center JR, Pocock NA, Eisman JA. Limited utility of clinical indices for the prediction of symptomatic fracture risk in post-menopausal women. *Osteoporos Int* 2004; 15:49–55.
218. Goemaere S, Zegels B, Toye K, Cremer S, Demuyneck R, Daems M, Dobbelaere K, Sedrine WB, Albert A, Dewe W, Kaufman JM, Reginster JY. Limited clinical utility of a self-evaluating risk assessment scale for post-menopausal osteoporosis: lack of predictive value of lifestyle-related factors. *Calcif Tissue Int* 1999; 65(5):354–8.

219. Ross PD, Genant HK, Davis JW, Miller PD, Wasnich RD. Predicting vertebral fracture incidence from prevalent fractures and bone density among non-black, osteoporotic women. *Osteoporos Int* 1993; 3(3):120–6.
220. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone* 2000; 27(5):585–90.
221. Solomon DH, Brookhart MA, Gandhi TK, Karson A, Gharib S, Orav EJ, Shaykevich S, Licari A, Cabral D, Bates DW. Adherence with osteoporosis practice guidelines: a multilevel analysis of patient, physician, and practice setting characteristics. *Am J Med* 2004; 117(12):919–24.
222. Wei GS, Jackson JL, O'Malley PG. Post-menopausal osteoporosis risk management in primary care: how well does it adhere to national practice guidelines? *J Am Med Womens Assoc* 2003; 58(2):99–104.
223. Castel H, Bonneh DY, Sherf M, Liel Y. Awareness of osteoporosis and compliance with management guidelines in patients with newly diagnosed low-impact fractures. *Osteoporos Int* 2001; 12(7):559–64.
224. Watts NB, Pols H, Ringe JD et al. Detection of "unexpected" osteoporosis: insights from the "IMPACT" trial. *Arthritis Rheum* 2001; 44:S256.
225. Indications and reporting for dual-energy X-ray absorptiometry. *J Clin Densitom* 2004; 7:37.
226. Kanis JA, Black D, Cooper C, Dargent P, Dawson-Hughes B, De Laet C, Delmas P, Eisman J, Johnell O, Jonsson B, Melton L, Oden A, Papapoulos S, Pols H, Rizzoli R, Silman A, Tenenhouse A. International Osteoporosis Foundation, National Osteoporosis Foundation. A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis. *Osteoporos Int* 2002; 13(7):527–36.
227. Kanis JA, Torgerson D, Cooper C. Comparison of the European and USA practice guidelines for Osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(1):28–32.
228. Siris ES, Chen YT, Abbott TA et al. Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures. *Arch Intern Med* 2004; 164:1108.
229. Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud KE et al. Hip fracture in women without osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2787.
230. Fracture Risk Calculator. Educational Tool Provided by The Alliance for Better Bone Health. Sanofi-aventis, 2007; HR.RIS.07.05.08.01
231. Lewiecki EM. Review of guidelines for bone mineral density testing and treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos REp* 2005; 3:75.
232. Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. U: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. The American Society for Bone and Mineral Research, 2003: 307-13.
233. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Senbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C et al. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2004; 15:38-42.
234. Osteoporosis. Clinical Guidelines for Prevention and Treatment. London: Royal College of Physicians, 1999.
235. Ross PD, Davis JW, Epstein RS. Pre-existing fractures and bone mass predict vertebral fracture incidence in women. *Ann Intern Med* 1991; 114:919-23.



236. Cuddihy MT, Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM, Melton LJ. Forearm fractures as predictors of subsequent osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 1999; 9:469-75.
237. Riggs BL, Melton LJ, 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* 1995; 17:505S.
238. Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ et al. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* 1993; 137:1001.
239. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS et al. Risk factors for hip fracture in white women. *N Engl J Med* 1995; 332:767.
240. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB et al. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res* 2000; 15:721.
241. Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ III. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res* 1992; 7:221.
242. Ferrar L, Jiang G, Adams J, Eastell R. Identification of vertebral fractures: An update. *Osteoporos Int* 2005; 16:717.
243. Lewiecki EM, Laster AJ. Clinical review: Clinical applications of vertebral fracture assessment by dual-energy x-ray absorptiometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4215.
244. Schousboe JT, Debold CR. Reliability and accuracy of vertebral fracture assessment with densitometry compared to radiography in clinical practice. *Osteoporos Int* 2006; 17:281.
245. Vokes T, Bachman D, Baim S et al. Vertebral fracture assessment: the 2005 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom* 2006; 9:37.
246. Russell-Aulet M, Wang J, Thornton JC et al. Bone mineral density and mass in a cross-sectional study of white and Asian women. *J Bone Miner Res* 1993; 8:575.
247. Wang MC, Aguirre M, Bhudhikanok GS et al. Bone mass and hip axis length in healthy Asian, black, Hispanic, and white American youths. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1922.
248. Gilsanz V, Roe T, Mora S et al. Changes in vertebral bone density in black girls and white girls during childhood and puberty. *N Engl J Med* 1991; 325:1597.
249. Meier D, Luckey M, Wallenstein S et al. Racial differences in pre- and postmenopausal bone homeostasis: association with bone density. *J Bone Miner Res* 1992; 7:1181.
250. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ III. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: Report from the national osteoporosis foundation. *J Bone Miner Res* 1997; 12:24.
251. Burge RT, Dawson-Hughes B, Solomon D, Wong JB, King AB, Tosteson ANA. Incidence and economic burden of osteoporotic fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Min Res* 2007; 22(3):465-475.
252. 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; 11:1010-8.
253. Ismail AA, Cooper C, Felsenberg D et al, the European Vertebral Osteoporosis Study Group. Number and type of vertebral deformities: Epidemiological characteristics and relation to back pain and height loss. *Osteoporos Int* 1999; 9:206-13.
254. Van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HGM, Cooper C. Epidemiology of fractures in England in Wales. *Bone* 2001; 29:517-22.

255. Melton LJ. Epidemiology of fractures. U: Riggs BL, Melton LJ Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1995; 225-247.
256. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis, Zagreb, 2004.
257. Grazio S, Koršić M, Jajić I. Prevalence of vertebral fractures in an urban population in Croatia aged fifty and older. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; 117(1-2):42-7.
258. Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* 2002; 110:161-4.
259. O'Shea JP, Davis S, Walker LR, Meltzer SP, Williams RG, Cheng S. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is abrogated in mice with a targeted mutation in the thyroid hormone receptor (TR)  $\beta$  gene and a thyrotoxic skeletal phenotype. *Endocrine Abstracts* 2007; 13:P16.
260. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* 2002; 2:389-406.
261. Ross DS, Neer RM, Ridgway EC, Daniels GH. Subclinical hyperthyroidism and reduced bone density as a possible result of prolonged suppression of the pituitary-thyroid axis with L-thyroxine. *Am J Med.* 1987; 82:1167-70.
262. Wejda B, Hintze G, Katschinski B, Olbricht T, Benker G. Hip fractures and the thyroid: a case-control study. *J Intern Med.* 1995; 237:241-7.
263. Biondi B, Palmieri EA, Klain M, Schlumberger M, Filetti S, Lombardi G. Subclinical hyperthyroidism: clinical features and treatment options. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(1):1-9.
264. Biondi B, Cooper DS. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr Rev.* 2008; 29(1):76-131.
265. Greenspan SL, Greenspan FS. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. *Ann Intern Med.* 1999; 130:750-8.
266. Vestergaard P, Mosekilde L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. *Thyroid.* 2002; 12(5):411-9.
267. Vestergaard P, Mosekilde L. Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk--a meta-analysis. *Thyroid.* 2003; 13(6):585-93.
268. Bordier P, Miravet L, Matrajt H, Hioco D, Ryckewaert A. Bone changes in adult patients with abnormal thyroid function (with special reference to  $^{45}\text{Ca}$  kinetics and quantitative histology). *Proc. R. Soc. Med.* 1967; 60:1132-4.
269. Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2,8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology* 1987; 120:1873-81.
270. Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 1994; 134:169-76.
271. Gothe S, Wang ZNgL, Kindblomm JM, Barrosm AC, Ohlssonm C, Vennstrom B, Forrest D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth and bone maturation. *Genes Dev.* 1999; 13:1329-41.
272. Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* 2003; 115:151-62.
273. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev* 2003; 4:638-49.
274. Novack VD. TSH, The Bone Suppressing Hormone. *Cell* 2003; 115(2)129-30.

275. Zaidi M, Sun L, Onigata K, Abe E. Direct actions of pituitary hormones on bone Endocrine Abstracts 2005; 10:S10.
276. Hase H, Ando T, Eldeiry L, Brebene A, Peng Y, Liu L, Amano H, Davies TF, Sun L, Zaidi M, Abe E. TNF $\alpha$  mediates the skeletal effects of thyroid-stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:12849-54.
277. Sun L, Davies TF, Blair HC, Abe E, Zaidi M. TSH and bone loss. Ann N Y Acad Sci 2006; 1068:309-18.
278. Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, Schiavi SC, McPherson JM, Vukicevic S. Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. J Bone Miner Res. 2007; 22(6):849-59.
279. 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. Intermittent recombinant TSH injections prevent ovariectomy-induced bone loss. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(11):4289-94.
280. Sampath KT, Šimić P, Sendak R, Drača N, Schiavi S, McPherson J, Giljević Z, Vukičević S. Thyroid stimulating hormone (TSH) may serve as a novel bone anabolic agent for postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int. 2006; 78(1):S35.
281. Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Mosekilde L. Fracture risk in patients treated for hyperthyroidism. Thyroid 2000; 10:341-8.
282. Bauer DC, Ettinger B, Nevitt MC, Stone KL. Risk for fracture in women with low serum levels of thyroid-stimulating hormone. Ann Intern Med. 2001; 134:561-8.
283. Jamal SA, Leiter RE, Bayoumi AM, Bauer DC, Cummings SR. Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. Osteoporosis Int. 2005; 16:534-40.
284. Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Cioffi M, Pilla P, Biondi B, Iorio S, Giustina A, Amato G, Carella C. Recombinant human TSH modulates in vivo c-telopeptides of type-1 collagen and bone alkaline phosphatase, but not osteoprotegerin production in postmenopausal women monitored for differentiated thyroid carcinoma. J Bone Miner Res 2005; 20:480-6.
285. Kim DJ, Khang YH, Koh J-M, Shong YK, Kim GS. Low normal TSH levels are associated with low bone mineral density in healthy postmenopausal women. Clinical Endocrinology 2006; 64:86-90.
286. Frevert EU, Biester A, Muller MJ, Schmidt-Gayk H, von zur Muhlen A, Brabant G. Markers of bone metabolism during short-term administration of thyroxine in healthy volunteers. Eur J Endocrinol 1994; 131:145-9.
287. Palha JA, Episkopou V, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, Saraiva MJ. Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain. J Biol Chem. 1994; 269(52):33135-9.
288. Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z, Vaananen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. Bone 1998; 23:155-61.
289. Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta-/- mice. J Clin Invest 1999; 104:895-901.
290. Ruegsegger P, Koller B, Mullar R. A microtomographic system for the non-destructive evaluation of bone architecture. Calcif Tissue Int 1996; 58:24-9.

291. Ito M, Nakamura T, Matsumoto T, Tsurusaki K, Hayashi K. Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with a hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone* 1998; 23:163-9.
292. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1167-74.
293. Hahn M, Vogel M, Pompesious-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor – a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992; 13:327-30.
294. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comp Meth Biochem Biomed Eng* 1997; 1:15-23.
295. Krempien B, Vukicevic S, Vogel M, Stavljenic A, Buchele R. Cellular basis of inflammation-induced osteopenia in growing rats. *J Bone Miner Res* 1988; 3:573-82.
296. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker, RR. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res* 1987; 2:595-610.
297. Vukicevic S, Krempien B, Stavljenic A. Effects of 1 $\alpha$ ,25- and 24R,25-Dihydroxyvitamin D on aluminum induced rickets in growing uremic rats. *J Bone Miner Res* 1987; 2:533-45.
298. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595–608.
299. Shen V, Birchman R, Xu R, Otter M, Wu D, Lindsay R, Dempster DW. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1995; 96:2331-8.
300. Meng XW, Liang XG, Birchman R, Wu DD, Dempster DW, Lindsay R, Shen V. Temporal expression of the anabolic action of PTH in cancellous bone of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1996; 11:421-9.
301. Genant HK, Wu CY, Kujik C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res*. 1993; 8(9):1137-48.
302. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporosis fractures. *Lancet* 2002; 359:1761-7.
303. Department of Health and Human Service. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon-General. Rockville: US Department of Health and Human Service, Office of the Surgeon General, 2004.
304. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367:2010-8.
305. Wenzel KW. Thyroid hormone and bone. *Thyroid* 1994; 4:508-9.
306. Abe E, Sun L, Mechanick J, Iqbal J, Yamoah K, Baliram R, Arabi A, Moonga BS, Davies TF, Zaidi M. Bone loss in thyroid disease: role of low TSH and high thyroid hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116:383-91.
307. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:7829-34.
308. Srivastava S, Toraldo G, Weitzman MN, Cenci S, Ros FP, Pacifici R. Estrogen decrease osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 2001; 276:8836-40.

309. Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, Takahashi T, Kadono Y, Oda H, Hikita A, Nakamura K, Tanaka S, Furukawa H. Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL. *J Exp Med* 2003; 197:1029-35.
310. Williams RG. Thyroid hormones/TR and bone. *Endocrine Abstracts* 2007; 14:S15.4
311. Karga H, Papapetrou PD, Korakovouni A, Papandroulaki F, Polymeris A, Pampouras G. Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(4):466-72.
312. Onigata K, Kowasi T, Nishiyama S, Micuno H, Morikawa A. Bone mineral density in human cases with TSH receptor gene mutations. 1st Conference on skeletal development and remodeling in health, disease and aging. *Proc N Y Acad Sci USA* 2005; 1:11.
313. Nagashima T, Murakami M, Onigata K, Morimura T, Nagashima K, Mori M, Morikawa A. Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid* 2001; 11:551-9.
314. Samura A, Wada S, Suda S, Iitaka M, Katayama S. Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-B ligand and macrophage colony-stimulating factor1. *Endocrinology* 2000; 141:3774-82.
315. Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003; 89:180-90.
316. Sampath KT, Simic P, Sendak R, Draca N, Schiavi S, McPherson J, Vukicevic S. Systemic administration of thyroid stimulating hormone (TSH) prevents and restores bone loss in rats following ovariectomy. *J Bone Miner Res.* 2005; 20:S415.
317. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine* 2007; 13(7):791-801.
318. Van Den Eeden SK, Barzilay JI, Ettinger B, Minkoff J. Thyroid hormone use and the risk of hip fracture in women > or = 65 years: a case-control study. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003; 12(1):27-31.
319. Sheppard MC, Holder R, Franklyn JA. Levothyroxine treatment and occurrence of fracture of the hip. *Arch Intern Med.* 2002; 162(3):338-43.
320. Rosen HN, Moses AC, Garber J, Ross DS, Lee SL, Ferguson L, Chen V, Lee K, Greenspan SL. Randomized trial of pamidronate in patients with thyroid cancer: bone density is not reduced by suppressive doses of thyroxine, but is increased by cyclic intravenous pamidronate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(7):2324-30.
321. Heijckmann AC, Huijberts MS, Geusens P, de Vries J, Menheere PP, Wolffenbuttel BH. Hip bone mineral density, bone turnover and risk of fracture in patients on long-term suppressive L-thyroxine therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(1):23-9.
322. Reverter JL, Holgado S, Alonso N, Salinas I, Granada ML, Sanmartí A. Lack of deleterious effect on bone mineral density of long-term thyroxine suppressive therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2005; 12(4):973-81.
323. Baldini M, Gallazzi M, Orsatti A, Fossati S, Leonardi P, Cantalamessa L. Treatment of benign nodular goitre with mildly suppressive doses of L-thyroxine: effects on bone mineral density and on nodule size. *J Intern Med.* 2002; 251(5):407-14.
324. Bauer DC, Nevitt MC, Ettinger B, Stone K. Low thyrotropin levels are not associated with bone loss in older women: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(9):2931-6.

325. Zimmermann-Belsing T, Langdahl B, Charles P, Feldt-Rasmussen U. Thyrotoxicosis – a risk factor for subsequent development of osteoporosis? *Endocrine Abstracts* 2006; 11:P865.
326. Quan ML, Pasiaka JL, Rorstad O. Bone mineral density in well-differentiated thyroid cancer patients treated with suppressive thyroxine: a systematic overview of the literature. *J Surg Oncol.* 2002; 79(1):62-9.
327. Morris MS. The association between serum thyroid-stimulating hormone in its reference range and bone status in postmenopausal American women. *Bone.* 2007; 40(4):1128-34.
328. Murphy E, Williams GR. T3 rather than TSH mediates the effects of altered thyroid status on bone turnover in man. *Endocrine Abstracts* 2007; 13:P328.
329. Williams AJ, Barnard JC, Bassett JHD, Williams GR. Thyroid hormones stimulate osteoblast differentiation but inhibit mineralization of bone nodules in vitro. *Endocrine Abstracts* 2006; 11:OC55
330. Murphy E, Williams AJ, Galliford TM, Costagliola S, Vassart G, Bassett JHD, Williams GR. TSH receptor action in osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Endocrine Abstracts* 2006; 11:OC51
331. Zaidi M, Sun L, Davies FT, Abe E. Low TSH Triggers Bone Loss: Fact or Fiction? *Thyroid* 2006; 16(11):1075-6.
332. Eleftheriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2339-49.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1. svibnja 1960.g. u Pločama, Republika Hrvatska, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1979. godine. Osim uspješnog studiranja (prosječna ocjena 4.47) aktivno sam se bavio društvenim i znanstveno-istraživačkim radom. Bio sam demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, objavio sam tri znanstvena rada, od kojih su dva prezentirana na Kongresima studenata medicine i stomatologije Jugoslavije 1983. i 1985. godine. Dva rada su nagrađena Prvomajskim nagradama Sveučilišta u Zagrebu za najbolji znanstveni rad. Diplomirao sam kod prof. dr. Josipa Sokolića na temi "Kirurško liječenje koronarne bolesti srca s osvrtom na ulogu rizičnih faktora" i promovirao na Medicinskom fakultetu u zvanje doktora medicine 25. travnja 1985. godine. Tijekom studija bio sam u Engleskoj (Manchester) na praksi u Klinici za unutarnje bolesti North Manchester General Hospital. Obvezni pripravnički staž od godinu dana obavio sam u DZ "Novi Zagreb" gdje sam položio i stručni ispit.

Od 1. ožujka 1987. godine sam radio kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Katedri za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma. Aktivno sam se bavio znanstveno-istraživačkim radom uz sudjelovanje na projektima Ministarstva znanosti, tehnologije i informatike kao znanstveni asistent. Bio sam aktivan istraživač suradnik na nizu projekata prof. dr. Mirka Koršića "Morfološke i funkcionalne osobine adenoma hipofize tj. endokrini i parakrini faktori rasta tumora", pok. prof. Tepavčevića "Uloga »faktora rasta« i gangliozida u onkogenezi tumora adenohipofize čovjeka" i "Neurotransmiteri u regulaciji adenohipofize", a danas sudjelujem na projektima Zavoda za endokrinologiju KBC Zagreb i Laboratorija za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U Ministarstvu znanosti, tehnologije i informatike upisan sam u registar istraživača u znanstveno-istraživačkom zvanju znanstveni asistent od srpnja 1991.g., s matičnim brojem 148383. Dobitnik sam stipendije Sveučilišta u Zagrebu za mlade istraživače i član Kluba stipendista Sveučilišta. Specijalizacija iz interne medicine odobrena mi je 27. lipnja 1989., a proveo sam je u Klinici za unutarnje bolesti KBC Zagreb, gdje sam položio specijalistički ispit u veljači 1994. godine s odličnim uspjehom. Završio sam poslijediplomski studij područja kemija, smjer biokemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i obranio magistarsku radnju s naslovom "Djelovanje stimulacijskih i supresivnih

tvori na lučenje prolaktina u normalnim i tumorskim laktotropnim stanicama hipofize" u lipnju 1991.g. Znanstveno-nastavno vijeće Medicinskog fakulteta promoviralo me je 9.7.1991.g. u znanstvenog asistenta, znanstveno-istraživačko zvanje za područje medicine.

Nakon specijalističkog ispita radim u Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb, predajem na poslijediplomskim studijima, dulje vrijeme sam vodio studentske seminare iz interne medicine za područje endokrinologije (5 godina). Uz svakodnevne aktivnosti na odjelu i ambulanti vrlo dobro sam se dokazao u organizacijskim odborima nekoliko velikih kongresa i simpozija: I i II Hrvatski endokrinološki kongres, Trakošćan 1996. i Šibenik 1999., Simpozij o hiperandrogenemiji, Zagreb 1996. i Bjelolasica 2006., I, II, III i IV Hrvatski kongres o aterosklerozi, Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja Dijagnostika bolesti štitnjače, Zagreb 1997.; I Hrvatski internistički kongres, Dubrovnik 1998. godine, I, II, III i IV Hrvatski kongres o osteoporozi, Rovinj 2001., Rovinj 2003., Šibenik 2005. i Dubrovnik 2007. godine. Aktivan sam član Hrvatskog liječničkog zbora i endokrinološke sekcije HLZ-a, Europske neuroendokrine asocijacije (ENEA), Europskog udruženja za istraživanje dijabetesa (EASD), International Osteoporosis Foundation (IOF) i European Calcified Tissue Society (ECTS). Redovito sudjelujem na gotovo svim važnijim međunarodnim kongresima iz područja endokrinologije. Objavio sam veliki broj znanstvenih i stručnih radova, u našim i stranim časopisima. Uže područja mog istraživanja su tumori hipofize, metaboličke bolesti kostiju (osobito osteoporoza) i hiperandrogenemija u žena. Voditelj sam nekoliko međunarodnih kliničkih studija iz područja osteoporoze, a sudjelujem u nizu istraživanja i domaćih studija iz područja endokrinologije.

Dopredsjednik sam Hrvatskog društva za osteoporoza i član uredničkog vijeća časopisa "Osteoporoza". Završio sam tečaj "Good clinical practice for investigators" u organizaciji Brookwood International Academy of Healthcare Research 1999. godine. Subspecijalistički ispit iz područja endokrinologije i dijabetologije položio sam u veljači 2001.g., a poslijediplomski studij managementa u zdravstvu s međunarodnom diplomom Health Services Management sam završio 2002.g.

Zlatko Giljević, mr. sc.



