

Ovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u dječjoj dobi o genskim polimorfizmima

Miškić, Blaženka

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:273397>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

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





Središnja medicinska knjižnica

Miškić, Blaženka (2010) *Ovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u dječjoj dobi o genskim polimorfizmima [The association of ultrasonography indicators of the pediatric bone mineral density and genetic polymorphisms]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/868>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Blaženka Miškić

**Ovisnost ultrazvučnih parametara
petne kosti u dječjoj dobi o genskim
polimorfizmima**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

**Disertacija je izrađena na Katedri za internu medicinu
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Ministarstvu
znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, tijekom
2006. - 2009. godine.**

Voditelj rada: doc. dr. sc. Darko Kaštelan

Zahvaljujem se prvenstveno mentoru doc. dr. sc. Darku Kaštelanu za svestranu pomoć koju mi je pružio tijekom izrade ovog rada. Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr. sc. Zorani Grubić i doc. dr. sc. Vesni Kušec koje su mi svojom susretljivošću i savjesnošću puno pomogle u genetskim i biokemijskim istraživanjima. Zahvala i Nevenki Meandžiji, dr. med. i Mariji Ivanko, dr. med. specijalistima školske medicine iz Slav. Broda na svesrdnoj pomoći. Zahvalna sam i dr.sc. Ozrenu Polašku na savjetima i kreativnosti u statističkoj obradi rezultata. Zahvala prof. dr. sc. Kristini Potočki i doc. dr. sc. Dragici Bistrović koje su mi bile trajni poticaj za izradu ovog rada. Na kraju zahvaljujem svim članovima Zavoda za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb, te članovima Internog odjela Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Najveća zahvala mojim roditeljima i mojoj obitelji na bezgraničnoj podršci i strpljivosti tijekom svih ovih godina.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. KOST OPĆENITO | 1 |
| 1.2. GRAĐA KOSTI | 2 |
| 1.2.1. Makroskopska organizacija kosti | 2 |
| 1.2.2. Kortikalna kost | 3 |
| 1.2.3. Trabekularna kost | 4 |
| 1.3. MIKROSKOPSKA ORGANIZACIJA KOSTI | 4 |
| 1.4. MINERALI I KOŠTANI MATRIKS | 6 |
| 1.4.1. Minerali | 6 |
| 1.4.2. Koštani matriks | 7 |
| 1.4.3. Koštani proteini | 8 |
| 1.4.4. Nekolageni proteini | 8 |
| 1.5. STANIČNA ORGANIZACIJA UNUTAR KOŠTANOG MATRIKSA ... | 13 |
| 1.5.1. Porijeklo i uništavanje osteoklasta | 17 |
| 1.5.2. Koštano remodeliranje | 18 |
| 1.6. KOŠTANI RAZVOJ I RAST | 20 |
| 1.6.1. Intramembranozno okoštavanje | 20 |
| 1.6.2. Enhondralno okoštavanje | 21 |
| 1.7. MARKERI KOŠTANE PREGRADNJE | 22 |
| 1.8. KOŠTANI RAST U DJETINJSTVU I ADOLESCENCIJI | 23 |
| 1.8.1. Akumulacija kosti i vršna koštana masa | 24 |
| 1.8.2. Vršna koštana masa | 26 |
| 1.9. GENETSKI UTJECAJ NA KOST | 27 |
| 1.9.1. Genetika osteoporoze | 27 |
| 1.9.2. α -receptor za estrogen | 31 |
| 1.9.3. Receptor za androgen | 31 |
| 1.9.4. Čimbenik rasta sličan inzulinu | 32 |
| 1.9.5. Aromataza | 32 |
| 1.10. PEDIJATRIJSKO MJERENJE KOŠTANE MASE | 33 |

| | |
|--|-----|
| 1.11. UTJECAJ ČIMBENIKA OKOLINE I HORMONA NA AKUMULACIJU KOSTI TIJEKOM RASTA..... | 35 |
| 1.11.1. Unos kalcija i vršna koštana masa..... | 36 |
| 1.11.2. Hormoni i vršna koštana masa | 37 |
| 1.12. PUBERTET, RAST I RAZVOJ I DINAMIKA RAZVOJA KOSTI | 38 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZA..... | 40 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 42 |
| 3.1. OPIS UZORKA..... | 42 |
| 3.2. MJERENJE ULTRAZVUČNIH PARAMETARA KOŠTANE GUSTOĆE..... | 42 |
| 3.3. LABORATORIJSKA MJERENJA | 43 |
| 3.3.1. Biljezi koštane pregradnje..... | 43 |
| 3.3.2. Analiza hormona..... | 43 |
| 3.3.3. Određivanje alela mikrosatelitnih lokusa..... | 43 |
| 3.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA | 45 |
| 4. REZULTATI | 47 |
| 5. RASPRAVA | 64 |
| 5.1. GENETIČKE ODREDNICE MINERALNE KOŠTANE GUSTOĆE KOD DJECE..... | 64 |
| 5.2. OKOLIŠNE ODREDNICE MINERALNE KOŠTANE GUSTOĆE KOD DJECE..... | 73 |
| 5.3. OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA | 76 |
| 6. ZAKLJUČAK | 78 |
| 7. SAŽETAK..... | 79 |
| 8. SUMMARY..... | 80 |
| 9. LITERATURA..... | 81 |
| 10. PRILOZI | 96 |
| 10.1. PRILOG 1 - ANKETNI UPITNIK | 96 |
| 10.2. PRILOG 2 - OBAVIJEST ZA PRISTANAK ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU..... | 98 |
| 10.3. PRILOG 3 - POJAŠNJENJE POSTUPAKA..... | 101 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 103 |

POPIS OZNAKA I KRATICA

| | |
|--|---|
| 25-OHD3 | 25- hidroksi vitamin D3 |
| SOS (engl. <i>speed of sound</i>) | brzina ultrazvučnog vala |
| BMC (engl. <i>bone mineral content</i>) | koštani mineralni sadržaj |
| BMD (engl. <i>bone mineral density</i>) | mineralna gustoća kosti |
| BUA (engl. <i>broadband ultrasound attenuation</i>) | slabljenje ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost |
| DNK | deoksiribonukleinska kiselina |
| DXA (engl. <i>dual x-absorptiometry</i>) | dvoenergetska apsorpciometrija x-zraka |
| EDTA | etilen-diamino-tetraacetat |
| GH (engl. <i>growth hormone</i>) | hormon rasta |
| IGF-I (engl. <i>insulin like growth factor-I</i>) | čimbenik rasta sličan inzulinu |
| K-AP | koštana alkalna fosfataza |
| PBM (engl. <i>peak bone mass</i>) | vršna koštana masa |
| PTH | paratiroidni hormon |
| SHBG | protein veznik spolnih globulina (engl. <i>sex hormon- binding globulin</i>) |
| QUI (engl. <i>quantitative ultrasound index</i>) | indeks kvantitativnog ultrazvuka |
| QUS (engl. <i>quantitative ultrasound</i>) | kvantitativni ultrazvuk |
| SOS (engl. <i>speed of sound</i>) | brzina ultrazvučnog vala |
| SZO | Svjetska zdravstvena organizacija |
| Troch | trohanter bedrene kosti |
| Ward | Wardov trokut |
| SHBG | nosač proteina veznika spolnih hormona |

1. UVOD

1.1. KOST OPĆENITO

Kost je po svojoj jedinstvenoj fizičkoj i kemijskoj strukturi jedan od najznačajnijih i najdjelotvornijih organa. Koštano tkivo je specijalizirano vezivno tkivo, izgrađeno od međustanične ovapnjene tvari, koštanog matriksa i tri različite vrste stanica: osteocita (grč. *steon*, kost + *kytos*), koji se nalaze u šupljinama matriksa (lat. *lacunae osseae*), osteoblasta, koji sintetiziraju organske sastojke matriksa i osteoklasta, multinuklearnih orijaških stanica, koje sudjeluju u resorpciji i pregradnji koštanog tkiva (1, 2).

Kosti skeleta čine oko 9% volumena ljudskog tijela i odgovorne su za oko 17% ukupne tjelesne težine organizma i stalno se pregrađuju. Po završetku koštanog rasta remodeliranje i kortikalne i trabekularne kosti se nastavlja tijekom života. Godišnje se remodelira oko 10% ukupne koštane mase, od toga svega 2% kortikalne kosti (3). Remodeliranje omogućava adaptaciju kosti na promjene koje nastaju tijekom mehaničkih opterećenja te obnavlja mikrooštećenja kosti (3).

Specifična građa kosti je odgovorna za tri glavne funkcije: potpornu, gdje snažno koštano tkivo omogućava normalno kretanje, zaštitnu, jer štiti sve vitalne organe: mozak, leđnu moždinu, srce i hematopoezu, te služi za održanje homeostaze kalcija koja sudjeluje u funkciji svih vitalnih organa. Kost je važan promotor različitih krvotvornih stanica i njihov rezervoar, kao i rezervoar iona fluora i stroncija koji se zajedno s kalcijem ugrađuju i stvaraju čvrsti koštani matriks. Jedinstvena potporna snaga kosti nastaje iz specifične koštane građe. Proteinska vlakna kolagena su otporna na sile vlaka, a minerali, kristali apatita su otporni na sile tlaka. Kristali apatita i kalcijevih fosfata koji su smješteni uzduž kolagenih vlakana još nepotpuno objašnjenim mehanizmima koordinirano i sinhronizirano održavaju potporna funkciju kosti (4).

Dokazano je da je za normalnu funkciju kosti potrebno prisustvo i minerala i organskog matriksa. Odsustvom jednog od elemenata dobijemo ili meku elastičnu kost ili tvrdi lako lomljivu kost. U oba slučaja nije postignuta normalna koštana funkcija (5).

1.2. GRAĐA KOSTI

Kost je kompleksno tkivo koji sadrži više komponenti. Dominanta komponenta su minerali kristali hidroksiapatita (HA). Glavne makromolekule kosti su odjeljci kolagena tipa 1 u kojima su odloženi kristali HA. Brojne nekolagene molekule koje se vežu za minerale igraju važnu ulogu u regulaciji procesa u kosti. Unutarnja koštana arhitektura je popuno prilagođena funkciji koju obavlja.

1.2.1. Makroskopska organizacija kosti

Makroskopski razlikujemo dva glavna tipa kosti: kompaktnu ili kortikalnu kost i trabekularnu ili kanceloznu kost. Trabekularna kost se nalazi u središtu kratkih kosti i potpuno je obložena kompaktnim tkivom. Pločaste kosti svoda lubanje imaju dva sloja kompaktnog koštanog tkiva između kojih se nalazi sloj spužvastog tkiva, diploe. Kortikalna kost se nalazi u dijafizama dugih kostiju i površinama kratkih kostiju. U tankom sloju se nalazi i na epifizama i metafizama dugih kostiju.

Razlike između kortikalne i trabekularne kosti su i strukturalne i funkcionalne, iako su nastale iz istih stanica i istih elemenata matriksa. Strukturalna razlika postoji u količini kalcificirane kosti: 80-90% kompaktne kosti je kalcificirano, dok je kod trabekularne kosti kalcificirano svega 15-25% ; ostatak volumena čini koštana srž. Bitno je naglasiti da 70-85% međudjelovanja s mekim tkivima se obavlja s unutrašnje površine kosti (6).

Funkcionalne različitosti su posljedica strukturalnih i obrnuto. Kortikalna kost ispunjava uglavnom mehaničku i protektivnu funkciju, a trabekularna metaboličku i mehaničku funkciju. Poprečno presječena kost promatrana golim okom, djeluje homogeno bez šupljina koje čini kompaktno koštano tkivo i područja s brojnim međusobno povezanim šupljinama koje predstavljaju spužvasto (spongiozno) koštano tkivo. Mikroskopski gledane obje vrste kosti unatoč različitom izgledu imaju jednaku histološku građu.

Postoje dvije koštane površine: vanjska ili periostalna je ona kojom je kost u dodiru s mekim tkivima i unutarnja ili endostalna površina je ona površina kojom je kost u dodiru s koštanom srži. Obje površine su odijeljene slojem osteogenih stanica koje se zovu periost i endost. Vanjski dio kosti je solidan i kompaktan; čini ga tanki

gusti sloj kalcificiranog tkiva, korteksa kompaktne kosti. Epifize dugih kostiju su krajnja proširenja izgrađena od spužvaste kosti prekrivene tankim slojem kompaktne kosti. U srednjem dijelu, dijafizi, kost je šuplja; izgrađena je od kompaktne kosti sa samo malo spužvaste kosti s unutrašnje strane. Šupljine u spužvastoj kosti i sržna šupljina u dijafizama dugih kosti sadržavaju koštanu srž, koja može biti crvena koštana srž, u kojoj nastaju krvne stanice i žuta koštana srž, koju najvećim dijelom izgrađuju masne stanice. Središte kratkih kosti, obično izgrađuje spužvasto koštano tkivo, koje je potpuno okruženo kompaktnim tkivom.

Između epifize i dijafize postoji prijelazna zona koja se zove metafiza. U kosti postoje brojne uske gredice ili trabekule spojene sitnim poprečnim vezama koje stvaraju prostornu trodimenzionalnu rešetku. Glavne trabekule se nalaze uzduž osovine kosti, nastaju tijekom rasta i predstavljaju glavni oslonac kosti. Tijekom rasta se epifize i metafize, koje potječu iz neovisnih osifikacijskih centara, razdvajaju slojem epifizne hrskavice. Ovaj sloj proliferativnih stanica i rastućeg koštanog matriksa je odgovoran za rast kosti u dužinu.

Vanjski dio kosti postaje kalcificiran, remodeliran i popunjen koštanim matriksom po završetku rasta. Pri pokretanju i prenošenju težine s jedne kosti na drugu opterećenje se prenosi s trabekularne kosti na kompaktni korteks koji se nalazi izvana. Specifična koštana građa na završecima kosti raspodjeljuje mehanička opterećenja nastala pri pokretanju, a snaga pokreta se raspodjeljuje kroz trabekule (7).

1.2.2. Kortikalna kost

Makroskopski, kortikalna kost izgleda gusta i sastoji se od Haversovih osteona s kanalićima kroz koje prolaze krvne žile. Osteoni predstavljaju cilindrične strukture s koncentričnim lamelama. U dijafizama dugih kostiju su orijentirani u smjeru uzdužnih osovina kosti. Pri ubrzanom formiranju kosti npr. kod histogeneze, cijeljenja frakturnih pukotina, tumora ili metaboličkih bolesti, ne uspeva se održati pravilna organizacija kolagenih vlakana. Ona se tada nalaze više-manje razbacana u snopovima. Nastaje mrežasta kost, koja predstavlja primarno koštano tkivo. Osteon je koštana jedinica formirana u Haversovom sistemu. Postoji različit stupanj mineralizacije između pojedinih osteona. Najniža je u mladim osteonima, a povećava se s dobi. Završna

faza mineralizacije može trajati tjednima, mjesecima ili čak i godinama. Ukoliko je kost manje gusta ona češće podliježe resorpciji i prije potpune mineralizacije (8).

1.2.3. Trabekularna kost

Trabekularna kost izgleda kao trodimenzionalna rešetka sastavljena od koštanih gredica i stupića unutar kortikalne ljušture. Mehanička svojstva i uloga u mineralnom metabolizmu oba tipa kosti su bitni za kvalitetu i snagu kosti.

1.3. MIKROSKOPSKA ORGANIZACIJA KOSTI

Po mikroskopskoj građi koštano tkivo se može podijeliti na: primarno, nezrelo ili vlaknasto i sekundarno, zrelo ili lamelarno. Primarna kost je prvo koštano tkivo koje se pojavljuje tijekom embrionalnog razvoja, nakon prijeloma i u drugim reparacijskim procesima. Primarno koštano tkivo je privremeno, koje u odraslih nadomjesti sekundarno koštano tkivo. Trajno ostaje na vrlo malo mjesta u tijelu, npr. u blizini šavova među pločastim kostima lubanje, u ležištima zuba i na mjestima hvatišta nekih tetiva. Primarno koštano tkivo razlikuje se od sekundarnog po nepravilnu razmještau kolagenih vlakana, manjoj količini minerala, te većem brojem osteocita.

Koštano tkivo u odraslih najvećim dijelom pripada vrsti sekundarne kosti. U njoj su kolagena vlakna poredana u lamelama debljine 3-7 μ m, koje teku usporedno jedne s drugom ili su raspoređene koncentrično oko krvožilnog kanala. Cijeli sustav koncentričnih koštanih lamela, oko kanala koji sadržava krvne žile, živce i rahlo vezivo, naziva se Haversov sustav ili osteon. Lakune s osteocitima nalaze se između, a katkada i unutar lamela. U svakoj su lameli kolagena vlakna međusobno usporedna. Granicu svakog Haversovog sustava čini istaložena amorfna, cementna tvar, izgrađena od mineraliziranog matriksa s malo kolagenih vlakana (10).

U kompaktnoj kosti (npr. dijafize dugih kostiju) lamele su pravilno raspoređene u Haversove sustave (osteone). Razlikujemo: vanjske osnovne ili kružne lamele, unutrašnje osnovne ili kružne lamele i intersticijske ili prijelazne lamele. Sve četiri vrste lamela se dobro vide na poprečnom presjeku kosti. Budući da je osnovna funkcija osteona donos hranjivih tvari kompaktnoj kosti, razumljivo je da tih sustava

nema u tankim gredicama spužvaste kosti, gdje hranjive tvari difundiraju u koštano tkivo iz okolnih krvnih kapilara (11).

Osteon je dugačak cilindar, često podijeljen u dvije grane, postavljen usporedno s uzdužnom osi dijafize. Sastoji se od središnjeg Haversovog kanala, koji je okružen s 4-20 koncentričnih lamela. Haversovi kanali su povezani s koštanom srži, periostom te jedan s drugim poprečnim ili kosim Volkmannovim kanalima. Volkmannove kanale ne okružuju koncentrične lamele, nego oni kroz njih prolaze. Svi krvožilni kanali u koštanom tkivu nastaju odlaganjem matriksa oko žila.

Zbog rasporeda kolagenih vlakana u lamelama vide se naizmjenični svijetli i tamni slojevi. Tok kolagenih vlakana unutar svake lamele je usporedan i teče spiralno. Vrh spirale je u različitim lamelama različito usmjeren, tako da se vlakna susjednih lamela, u svakoj točki sijeku približno pod pravim kutovima. Na poprečnim presjecima osteona, kolagena vlakna jedne lamele presječena su poprečno, dok su u susjednoj presječena koso ili gotovo uzdužno. Veliki broj lamela s različito usmjerenim vlaknima, daje kosti čvrstoću unatoč njezinoj maloj težini.

Promjer Haversovih kanala je vrlo različit. Svaki osteon nastaje uzastopnim odlaganjem lamela počevši od periferije prema središtu tako da mlađi osteoni imaju šire kanale. U dovršenim osteonima, lamela koja je nastala posljednja nalazi se najbliže središnjem Haversovu kanalu (11). Tijekom rasta, pa i u kostima odraslih, osteoni se trajno razgrađuju i izgrađuju. Zbog toga se mogu vidjeti i osteoni koji su izgrađeni od širokog središnjeg kanala i oni sa samo nekoliko lamela.

Unutrašnje i vanjske osnovne ili kružne lamele se nalaze oko sržne šupljine i neposredno ispod periosta. Vanjskih ima više od unutrašnjih. Između dvaju sustava osnovnih lamela nalaze se brojni osteoni, a prostore između njih ispunjavaju trokutaste ili nepravilno oblikovane skupne usporednih lamela koje se nazivaju prijelazne ili intersticijske lamele. One su ostaci osteona razgrađenih tijekom rasta i pregradnje kosti.

1.4. MINERALI I KOŠTANI MATRIKS

1.4.1. Minerali

Anorganska tvar čini oko 50% suhe težine organskog matriksa (6, 11). Koštani minerali su kompleksne i netopive čestice koje imaju relativno dugačko biološko vrijeme poluraspada i koji ispunjavaju morfološku i mehaničku funkciju skeleta zajedno s kolagenom. Mineralni udio kosti ima glavnu ulogu u održanju mineralnog metabolizma i homeostaze kosti. Iako nema usporedive fiziološke funkcije pridružene ostalim komponentama organskog koštanog matriksa, izgleda, da je s biološke točke gledišta, mineralni matriks najinertnija komponentna koštanog tkiva.

Kemijski, mineralni dio kosti se sastoji od kalcija, soli fosfata i malih ali značajnih količina karbonata (4-6% težine) i manje od 1% ostalih iona kao što su natrij, kalij, magnezij, fluoridi i kloridi. Poznato je da je polovima ukupne količine magnezija u tijelu smještena u kostima. Minerali su bitni za život. Oni su aktivatori enzima od kojih se neki nalaze uglavnom u kosti kao npr.: alkalna fosfataza i pirofosfataza koji su četvrti najrasporostranjeniji kationi u skeletu (12).

Koštani apatit se razlikuje od geološkog apatita jer je manji (10-40nm) i ima manje idealno poslaganu atomsku rešetku i stehiometrijsku građu, što ga čini više reaktivnim i topivim. Kemijska struktura kosti se sastoji od mješavine amornog trikalcij fosfata i hidroksiapatita, ali ima i dosta amornog nekristaličnog kalcij-fosfata, te slabo kristaličnog karbonata. Mala količina kristaličnog karbonatnog dijela, po velikoj jedinici težine, uz visoku količinu koštanih minerala, omogućava direktnu izmjenu s tjelesnim tekućinama. Kristali hidroksiapatita koji leže duž kolagenih vlakana, okruženi su amornom osnovnom tvari. Ioni na površini hidroksiapatita su hidrirani, te se oko kristala nalazi sloj vode i iona. To je hidratacijska ljuska i ona olakšava izmjenu iona između kristala i tjelesnih tekućina. Ioni jednake veličine i iste mogućnosti vezivanja komponenti Ca^{2+} ili PO_4 , i OH iona se normalno zamjenjuju za one s površine rastućih kristala. Kost je tako u mogućnosti ugraditi takve ponuđene ione kao što su ioni magnezija, stroncija i lantanida iz tjelesnih tekućina.

Općenito, ugradnja takvih iona, čini kristale u mineralu više nesavršenim i lakše topivim. Nasuprot tome, ugradnja fluorida umjesto OH skupine u strukturi apatita, stvara veće, teže topive, koštane mineralne kristale koji usporavaju i

vezivanje i ugradnju minerala u kristala. Mehanizam je bio poticaj za početak terapije fluoridima u liječenju osteoporoze (5, 12).

1.4.2. Koštani matriks

Organski matriks je najvažniji dio kosti. Ekstracelularni koštani matriks je sastavljen uglavnom od proteina kolagena tip 1 koji čini 85-90% ukupne strukture. Poznato je da je gen za tip 1 kolagena identičan u svim vezivnim tkivima tijela. Smatra se da je ista genetska osnova kolagena iz koštanog matriksa prisutna i kao sastavni dio nekolagenog tkiva, što govori u prilog opsežnoj genetskoj regulaciji i snažnom genetskom učinku na koštano tkivo (13). Proteini su usko vezani za koštani kolagen i s njim tvore građevnu strukturu koja u potpunosti ispunjava sve biokemijske, biomehaničke i homeostatske zahtjeve tijekom cijelog života.

Formiranje mineraliziranog koštanog tkiva nastaje zajedničkim djelovanjem osteoblasta i žilnog sistema. Makromolekularne komponente, dobivene endogeno, iz tkivno specifičnih stanica, kao što su kolagen, osteokalcin, osteonektin, koštani sijaloproteini, promotori proteina koštanog rasta (IGF-1), IGF-II, transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β), fosfoproteina, proteoglikana i iz cirkulirajućih proteina plazme, postaju dijelovi minerala ekstracelularnog matriksa. Koštani sijaloprotein i osteokalcin sadržavaju nekoliko γ - karboksiglutaminskih kiselinskih ostataka (Gla), koji imaju jak afinitet prema kalciju te im se pripisuje uloga u početnom ovapnjenju koštanog matriksa. Glikozaminoglikani u koštanom tkivu su hondroitin -4-sulfat, hondroitin-6-sulfat i keratin-sulfat.

Poznato je iz kojeg dijela kosti se luče pojedine komponente ekstracelularnog koštanog matriksa. Kolagen, proteoglikani i neki nekolageni proteini se izlučuju iz osteoblasta na površini osteoida. Osteokalcin i ostale velike molekule koje su potrebne za mineralizaciju dolaze posredstvom osteoblastnih djelovanja i izlučuju se direktno u zonu aktivne mineralizacije.

Povezanost hidroksiapatita s kolagenim vlaknima uvjetuje čvrstoću i otpornost što su značajke koštanog tkiva. Nakon dekalcinacije oblik kosti ostaje sačuvan, ali ona postaje savitljiva poput tetive. Nakon odstranjenja organskog matriksa, a to je uglavnom kolagen, kost također zadržava svoj osnovni oblik, ali postaje lomljiva, lako puca i mrvlji se (13).

1.4.3. Koštani proteini

Kolagen u kosti je tip 1. Isti je i u koži i tetivama. Osim kolagena tip 5 niti jedan drugi oblik nije nađen u koštanom matriksu. Druga tkiva koja sadržavaju kolagen tipa 1 u normalnim uvjetima ne ovapnjuju i ne sadržavaju ove glikoproteine (14). Netopiva kolagena vlakna u kosti su nastala iz topivih pojedinačnih molekula tropokolagena, koji je učvršćen intermolekulanim poprečnim svezama, dobivenim od aldehidnih formi hidrolizina i lizina. S dobi se smanjuje količina aktivnih zrelih kolagenih vlakana. Današnjim metodama se analizira postojanje 3-hidroksipiridinskih veza zrelog kolagena, piridinolina (pyr), deoksipiridinolina (D-pyr), i serumskih N-telopeptida tipa 1 kolagena (NTX) u urinu i NTX u serumu. Ove intermolekularne komponente kolagena su prisutne samo u zrelom kolagenu i specifične samo za kost i hrskavicu. Smatra se da su one senzitivni i specifični pokazatelj koštane resorpcije (15). Urinarni hidroksiprolin koji je ranije korišten kao marker koštane razgradnje nije specifičan za kost.

1.4.4. Nokolageni proteini

Glavni nekolageni proteini kosti su proteoglikani, proteini γ karboskiglutamične kiseline (Gla), glikoproteini, fosfoproteini i proteini plazme. Prisutnost osteokalcina i koštanih sijaloproteina predstavlja jedinstvenu ekspresiju osteogenog fenotipa.

Proteolikani su glavna skupina nekolagenih proteina prisutnih u mineraliziranom matriksu. Čine oko 10% svih nekolagenih proteina. Proteoglikani se sastoje od centralne proteinske jezgre, na koju su vezani polisaharidni lanci, glikozaminoglikani, koji su jaki polianioni za karboksilate i sulfate.

U kosti su identificirana i dva mala proteoglikana: PG-I (nazvan „biglikan“ jer su uhvaćena oba lanca) i PG-II („dekorin“ jer izgleda kao da ukrašava kolagena vlakna) (16). Iako nije potvrđena definitiva funkcija proteoglikana, ni u sazrijevujućoj kosti, ni u zreloj, mnoge studije pokazuju, da su proteoglikani usko povezani s kolagenim vlaknima i da utječu i na brzinu njihovog rasta, debljinu vlakana, a time i na kompletnu izgradnju kolagena (17).

Osteokalcin je protein male molekularne mase 5.2-5.9 kDa. Molekule osteokalcina od svih temeljnih nekolagenih proteina predstavljaju najbrojniju i

najpravilniju strukturu. Čine oko 10-20% svih nekolagenih proteina i imaju veliki afinitet za ione kalcija. Osteokalcin se još zove i vitamin K ovisni koštani protein. Sadrži dvije ili tri ostatne jedinice γ -karboksiglutaminske kiseline (Gla). Biokemijska funkcija ove molekule još nije u potpunosti jasna. Kontroverzna je uloga K vitamina. Iako je poznato da je za stvaranje rezidua Gla potreban K vitamin, ne dolazi do nikakvih promjena u koštanoj histologiji i mineralnom metabolizmu, eksperimentalnom upotrebom, antagonista K vitamina. Klinički je poznato da dugotrajna upotreba lijekova protiv zgrušavanja krvi utječe na propadanje kosti (18).

Koncentracija serumskog osteokalcina se povećava pri povećanom stvaranju kosti i ubrzanjem koštane pregradnje. Poznato je odlično vezivanje osteokalcina za hidroksiapatit. Vjeruje se da je osteokalcin odgovoran za stvaranje mineralizirane kosti, kontrolirajući ugradnju i rast kristala hidroksiapatita. U laboratorijskim uvjetima sinteza osteokalcina se višestruko povećava dodavanjem 1,25-dihidroksivitamina D₃ (19). Analog osteokalcina koji je prisutan u hrskavičnom tkivu zove se matriks Gla protein (20).

U kosti su pronađeni i brojni glikoproteini. To su sijaloprotein, osteopontin, osteonektin, alkalna fosfataza, koštani faktori rasta kao koštani morfogenetski protein (BMP) i čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF). Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF β), Fibroblastni čimbenik rasta (FGF) Trombocitni čimbenik rasta (PDGF), lipoproteinski receptor 5 lipoproteina niske gustoće (LRP 5) i drugi.

Koštani sijaloprotein je bio prvi nekolageni protein koji je otkriven u koštanom matriksu; čini 61% ukupnih nekolagenih proteina (21). Poznata su dva sijaloproteina: osteopontin i koštani sijaloprotein (BSP) koji su adhezijske molekule koje posreduju u prihvaćanju proteina za različite tipove stanica uključujući i koštane stanice. Sijaloproteini imaju jaki afinitet vezanja za hidroksiapatit. Radi porijekla iz osteoida i formiranja mostova između stanica i mineralnog matriksa, sijaloprotein I je nazvan osteopontin (21). Oba proteina imaju različit mehanizam djelovanja in vivo i in vitro. Uz stimulaciju stvaranja osteopontina i mobilizacije kalcija iz kosti, pod utjecajem 1,25-dihidroksi-vitamina D₃, potvrdilo se da osteopontin ima bitnu ulogu u obnavljanju prekursora osteoklasta i njihovom vezivanju za mineralizirani koštani matriks. Potvrda ove hipoteze se nalazi u činjenici da u to vrijeme osteoklasti izlučuju velike količine adhezijskih receptora (integrina) istih ili sličnih, vezanih za vitronektinski receptor. Taj integrin je receptor za osteopontin. Nasuprot osteopontinu, BSP možda nije specifičan samo za koštano tkivo, iako se vjeruje da su koštane stanice glavni

proizvođač glasnika za sintezu BSP. Poznato je da hrskavica i ostaci posteljice sadrže male količine glasnika za sintezu BSP (21).

Osteonektin, osteopontin, koštani sijeloprotein i ostali proteini kosti su hvatači glikoproteina kao npr.: fibronektin, laminin i hondronektin u drugim tkivima. Oni vežu kolagen i proteoglikane na receptore stanične površine i stvaraju velike molekularne komplekse, koji posreduju pri vezivanju i stimulaciji rasta stanica, njihovoj migraciji i diferencijaciji (20). Poremećaj u djelovanju između stanica u ekstracelularnom matriksu, izazvan upalom ili drugim bolestima, može dovesti do gubitka tkivne strukture i funkcije.

Alkalne fosfataze su grupa izoenzima vezanih za membranu glikoproteina molekularne mase od 100-200 kDa; smješteni su na staničnoj membrani i služe kao nosači ili odašiljač signala. Alkalna fosfataza je uključena u: povećanje lokalne koncentracije anorganskih fosfata (P_i); destrukciju inhibitora rasta kroz ugradnju mineralnih kristala preko fosfohidrolaze; djeluje kao nosač P_i ; kalcij vežući protein; aktivator kalcijske pumpe u stanicama ili vezikulama; djeluje kao regulator stanične izgradnje i diferencijacije kroz tirozin specifičnu fosfoproteinsku fosfatazu.

Čimbenici rasta su polipeptidi koji djeluju na replikaciju i diferencijaciju ne diferenciranih stanica, povećavajući ili snižavajući njihovu prisutnost u tkivima. Kontrolirajući diferencijaciju imaju značajnu ulogu u koštanom remodeliranju. Remodeliranje kosti je kompleksni proces koji uključuje brojne koordinirane aktivnosti tijekom razgradnje i izgradnje nove kosti. Kontinuirana pregradnja kosti je regulirana sistemskim hormonima i lokalnim faktorima koji utječu i na osteoblaste i osteoklaste (23).

Aktivnost im može biti regulirana različitim mehanizmima koji uključuju i sintezu i aktivaciju receptora, vezača receptora i njihovih proteina. U kosti postoje brojni faktori rasta koji su važni u procesima formiranja i razgradnje kosti. Lokalni faktori rasta se sintetiziraju u osteoblastima, neki citokini nastaju iz stromalnih stanica i stanica imunološkog ili hematopoetskog sistema; oni su prisutni u mikrookolini kosti. Čimbenici rasta mogu biti prisutni u cirkulaciji i djelovati kao sistemski regulatori koštanog metabolizma.

Čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF) je polipeptid molekularne mase oko 7600 (24). Struktura mu je jako slična proinzulinu, kao i mehanizam djelovanja na stanični rast, diferencijaciju i mitoze. Razlikujemo dva IGF: IGF-1 (sinonim mu je somatomedin C) i IGF-II (sinonim- skeletni čimbenik rasta). Prisutni su u mnogim

tkivima, uključujući kost, gdje djeluju kao lokalni regulatori staničnog metabolizma. Produkcija sistemskog IGF-I koji se luči u jetri, ovisi o djelovanju hormona rasta, a nastanak IGF-1 koji se sintetizira u perifernim tkivima, reguliran je različitim hormonima (24). U cirkulaciji je IGF vezan za proteinske nosače (IGFBP) u obliku labilne kiselinske podjedinice (24, 25). Dokazana je prisutnost šest formi proteinskih nosača za čimbenike rasta slične inzulinu koji imaju različitu aktivnost od neutraliziranja do pojačanja metaboličke aktivnosti IGFs. Utječu na mitogenu aktivnost osteoplastnih stanica i ubrzavaju nastanak zrelih osteoplasta povećavajući proizvodnju koštanog matriksa (26). Spriječavajući i prevenirajući apoptozu osteoplasta, IGFs učestvuju u održavanju velike količine zrelih osteoplasta (27). IGFs povećavaju transkripciju kolagena tip 1, a smanjuju transkripciju kolagenaze 3 ili matrične metaloproteinaze (MMP)-13 koja razgrađuje kolagene proteine (28). Smanjenjem koncentracije kolagenaza, IGFs inhibira degradaciju kolagena. Dvostruki efekt: povećanje sinteze kolagena i smanjenje degradacije doprinosi održanju koštanog matriksa i ukupne koštane mase. Dodavanje IGFs kod ljudi izaziva anaboličke efekte ubrzanjem koštanog remodeliranja (29). Niski IGF-I korelira sa smanjenjem BMD kod starijih žena i osoba s anoreksijom i nervozom (29, 30).

Dokazano je prisustvo IGF-II u koštanom matriksu, gdje je fiksiran na kristale hidroksiapatita; djeluje samo nakon što bude oslobođen tijekom koštane resorpcije. Luči se u ekstracelularnu tekućinu i akutno djeluje na prekursore osteoplasta. Djelovanje mu je lokalno autokrino i parakrino. Paratirodni hormon (PTH) je glavni pokretač stvaranja IGF-i u osteoplastima i poznat je anabolički efekt PTH na kost (27). Vidljivo je da primjena glukokortikoida smanjuje proizvodnju kosti. Glukokortikoidi preko kontrole oslobađanja pojačivača vezača, nosača proteinskih lanaca α i β , porijeklom iz transkripcijskih faktora rasta, inhibiraju djelovanje IGF-I na kost tako da: inhibiraju transkripciju IGF-I, njegovu sintezu, posljedično tome i djelovanja koja ima na diferencijaciju osteoplasta (31, 32).

Koštani morfogenetski proteini su članovi obitelji transformirajućih čimbenika rasta β (TGF β) koja uključuje TGF β , aktivine i inhibine (34, 35, 36). To su proteini koji imaju karakteristični oblik; sintetiziraju se u skeletnim i vanskeletnim tkivima i imaju važnu ulogu u sintezi i djelovanju osteoplasta. BMP-2, -4, -6 se sintetiziraju u osteoplastima i autokrino ih reguliraju (35, 36, 37). Jedini induciraju diferencijaciju stanica osteoplastne linije i pojačavaju djelovanje osteoplasta (37). Signalizacija se

odvija preko serin/treonin kinaznih receptora i signala Smads koji modificiraju oslobađanje BMP i regulaciju osteoblastne aktivnosti (38).

Transformirajući čimbenik rasta β je polipeptid. Kod sisavaca postoju u tri izoforme s istom biološkom aktivnošću, sintetizira se u koštanim stanicama. To su TGF β_1 , β_2 i β_3 . TGF β stimuliraju replikaciju preosteoblasta, sintezu kolagena i inhibiraju koštanu resorpciju izazivajući apoptozu osteoklasta (39). Nivo TGF β može biti različit ovisno o procesima aktivacije ili sinteze koji su regulirani različitim genima, hormonima i ostalim faktorima. TGF β se pojavljuje u inaktivnoj formi kao prekursor i onda se veže na proteinske nosače. Lijekovi koji razgrađuju kost ga mogu inducirati i aktivirati i tako aktivno sudjelovati u koštanom remodeliranju (40).

FGF 1 i 2 su polipeptidi; članovi su velike obitelji vezanih gena. Imaju značajnu ulogu u angiogenezi, važni su za neovaskularizaciju, cijeljenje rana i popravak kosti. FGF 1 i 2 stimuliraju replikaciju koštanih stanica, čime povećavaju količinu koštanih stanica koje su sposobne sintetizirati kolagen (41). Kost tretirane FGF, sintetiziraju veće količine kolagenog matriksa i imaju veći broj stanica koje sintetiziraju kolagen. FGF ne potiče direktno diferencijaciju osteoblasta. Važni su u održavanju koštane mase (42). Imaju malu ulogu u koštanoj resorpciji jer ekspresijom MMP-13 degradiraju i remodeliraju kolagen (43). FGF2 ubrzava cijeljenje prijeloma. TGF β i FGF povećavaju ekspresiju FGF u osteoblastima, podvrgavajući ju lokalnoj kontroli. Poznata su četiri FGF receptora koji imaju različit utjecaj na rast skeleta, endostalni rast i hondrogenezu. Njihove mutacije mogu rezultirati različitim anomalijama skeleta (41-43).

Čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (PDGF) se smatra važnim čimbenikom u početnoj fazi zacjeljivanja rana (44). Luči se i u normalnim i neoplastičkim tkivima; djeluje kao sistemski i lokalni regulator tkivnog rasta. PDGF je dimer koji je produkt dva gena; može biti prisutan u homodimernom ili heterodimernom obliku; aktivnosti su mu slične FGF. Stimulira replikaciju koštanih stanica i sintezu kolagena. Nema direktni stimulacijski utjecaj na diferencijaciju osteoblasta i inhibira odlaganje minerala u kost (45). Utječe i na resorpciju kosti povećavajući broj osteoklasta i inducira ekspresiju MMP-13 u osteoblastima. PDGF-B lanci se vežu na osteonektin i bitni su za održanje koštane strukture i funkcije (45).

1.5. STANIČNA ORGANIZACIJA UNUTAR KOŠTANOG MATRIKSA

Koštani matriks je metabolički aktivno tkivo a stanice: osteociti se nalaze duboko ukopani u kosti u malim osteocitnim lakunama, koje čine oko 25 000/mm³ vol. kosti, između lamela matriksa; nastaju od osteoblasta (3-5). Osteociti čine staničnu mrežu sličnu neuralnoj za koju se vjeruje da koordinira signalizaciju staničnih elemenata, citokina, faktora rasta i ostalih faktora i tako odgovara na mehaničke deformitete nastale opterećenjem kosti. Rani biokemijski odgovor na mehaničko opterećenje uključuje indukciju sinteze prostaciklina i dušičnog oksida (NO) Potom dolazi do porasta koncentracije IGFs, promjena u transportu aminokiselina i posljedičnog povećanja stvaranja nove kosti.

Međusobna komunikacija i prehrana osteocita se odvija kroz citoplazmatske izdanke, kroz koje hranjive tvari dolaze u stanicu ili preko tijesnih staničnih spojeva ili kroz linijske stanice na površini kosti u području endostija ili periostija (6, 7-9). Izdanci nastaju tijekom formiranja koštanog matriksa i prije njegove kalcifikacije. Oni čine mrežu tankih kanalića koji prožimaju koštani matriks. Osteociti su spljošteni, imaju oblik badema, mnogo oskudniju hrapavu endoplazmatsku mrežicu i Glogijev kompleks te zgusnuti kromatin jezgre. Osteociti svojim metabolizmom održavaju koštani matriks.

Upitno je da li osteociti mogu sintetizirati ili resorbirati novi koštani matriks s površina osteocitnih lakuna. Zna se da su osteociti primarne stanice kosti koje u odgovorne za prenošenje signala kroz kanaliće do stanične površine tijekom mehaničkih opterećenja kosti. Osteociti su tijekom koštane resorpcije fagocitirani ili razgrađeni apoptozom zajedno s ostalim komponentama kosti. Zna se da imaju važnu ulogu u lokalnoj regulaciji koštane pregradnje.

Nakon propadanja osteocita matriks se resorbira. Prostor između membrane osteocita i koštanog matriksa u lakunama i u kanalikulama se zove periostalni prostor u kojem se nalazi ekstracelularna tekućina (bone ECF) (9,10). Izmjena tvari između osteocita i krvnih žila obavlja se i putem male količine izvanstanične tvari, koja se nalazi između osteocita i njihovih izdanaka i koštanog matriksa.

Novija istraživanja pokazuju da mehanička naprezanja kosti značajno smanjuju nivo apoptoze osteocita, što bi ukazivalo na to da je eventualna deformacija koštanog matriksa bitna za preživljenje osteocita. S druge strane neupotreba kosti potiče izlučivanje kolagenaze u osteocitima što opet pokazuje da ove stanice imaju

značajan utjecaj pri formiranju i resorpciji koštanih stanica i da na nju utječu vlastitim lokalnim utjecajima (11).

Vanjsku i unutrašnju površinu kosti oblažu stanice koje stvaraju kost i vezivo te čine periost i endost. To su mezenhimalne stanice koje se nalaze na vanjskoj endostalnoj površini i kortikalne i trabekularne kosti kao i na unutrašnjoj endostalnoj površini haversove kosti. Periostalna površina svih kosti je prekrivena gušćim slojem mezenhimalnih stanica i fibroblasta. Periost (pokosnica) se sastoji od vanjskog sloja kolagenih vlakana koja iz periosta prodiru u koštani matriks i povezuju periost s kosti nazivaju se Shaarpeyeva vlakna. Unutrašnji sloj periosta sadržava mnogo sploštenih stanica, koje se mogu dijeliti i diferencirati u osteoblaste. Te koštane prastanice, osteoprogenitorne stanice, imaju karakterističan smještaj, vretenast oblik, oskudnu hrapav endoplazmatsku mrežicu i slabo razvijen Golgijev kompleks. One ugrađuju ³H-timidin, koji se kasnije može dokazati autoradiografski u osteoblastima. Imaju važnu ulogu u rastu i u cijeljenju kosti (1-4).

Endost prekriva sve unutrašnje površine šupljina u kosti, a izgrađuje ga jedan sloj sploštenih koštanih prastanica s vrlo malo vezivnog tkiva, puno je tanji od periosta. Glavne funkcije periosta i endosta su prehrana koštanog tkiva i trajna opskrba novim osteoblastima, koji su potrebni za obnovu i rast kosti (1-4).

Osteoblasti su stanice koje služe za formiranje kosti; sintetiziraju organske sastojke koštane međustanične tvari: kolagen tipa 1, proteoglikane i glikoproteine, a nužni su i za ugrađivanje anorganskih sastojaka u matriks. Potječu iz lokalnih mezenhimalnih stanica (iz stromalnih stanica koštane srži ili iz vezivno tkivnih mezenhimalnih stanica). Uvijek su smješteni na površinama koštanog tkiva, poredani u nizu poput stanica jednoslojnog epitela. Osteoblasti su polarizirane stanice. Tijekom intenzivne sinteze matriksa, osteoblasti su kubičnog do prizmatičnog oblika, citoplazma im sadrži puno alkalne fosfataze. Kad im se aktivnost smanji, spljošte se, i količina alkalne fosfataze se smanji. Imaju citoplazmatske izdanke kojima međusobno komuniciraju; nikad ne djeluju individualno, uvijek u nakupinama kuboidnih stanica duž koštane površine i nađe ih se otprilike 100-400 stanica po jedinci izgradnje kosti (4,5).

Uvijek se nalaze u sloju novo proizvedenog koštanog tkiva koje još nije kalcificiralo (osteoid). Osteoid nastaje u vrijeme, između nastanka matriksa, prije kalcifikacije osteoidnog tkiva. Za sazrijevanje osteoida treba oko 10 dana. Uz osteoblaste se nalazi i 1-2 sloja aktivnih mezenhimalnih stanica koje proizvode

preosteoblaste. Osteoblasti su koštane stanice odgovorne za proizvodnju komponenti matriksa (i kolagena i strome). Imaju važnu ulogu i u procesu kalcifikacije matriksa. Kada se osteoblast potpuno okruži tek izlučenim matriksom, postaje osteocit. Pojavljuju se lakune i kanalići, jer se matriks odlaže oko stanice i njezinih citoplazmatskih izdanaka. Apozicija kosti završava se odlaganjem kalcijevih soli u novostvoreni matriks.

Plazmatska membrana osteoblasta je bogata alkalnom fosfatazom, čija se prisutnost u serumu koristi kao indeks izgradnje kosti (13,15). Poznato je da neki genetski faktori reguliraju skeletni rast i razvoj. Dokazano je da prisutnost nuklearnog faktora CBFA1 određuje diferencijaciju mezehimalnih stanica u red osteoblasta. Brojni citokini i faktori rasta utječu na formiranje kosti. Prekursori osteoblasta pod adekvatnom stimulacijom podliježu proliferaciji i diferencijaciji u preosteoblaste i zrele osteoblaste (13).

Na membrani osteoblasta postoje i receptori za PTH. PTH je sistemski hormon koji je odgovoran za produkciju lokalnih faktora kao npr: inetrilukina -6 (IL-6), prostaglandina i čimbenika rasta sličnog inzulinu (IGFs) u kosti. Na membrani osteoblasta ne postoji receptor za kalcitonin. U jezgri osteoblasta postoji steroidni receptor za estrogen i vitamin D3 kao i za neke adhezijske molekule (integrine) i receptore za citokine. Osteoblasti a i koštane stromalne stanice proizvode brojne faktore koji mogu biti regulatori koštane funkcije i autokrino i parakrino. Luči se čitav niz citokina i čimbenika rasta: IGFs, FGFs, Transformirajući čimbenici rasta beta (TGF- β) kao i koštani morfogenetski proteini (BMPs) koji remodeliraju procese izgradnje kosti i sudjeluju u patogenezi koštanog metabolizma (35,38). Dolazi do aktivacije citokina na membrani: naročito kolonijskog stimulirajućeg čimbenika 1 (CSF-1) i RANKL koji dovodi do osteoklastogeneze lokalnim parakrinim djelovanjem. Luči se i osteoprotegerin koji prekriva RANK receptor i inhibira stvaranje osteoklasta (7-10).

Neki od ovih faktora utječu i na proizvodnju hrskvice, hrskavični morfogenetski proteini (CMPs). Neki citokini proizvedeni i u stromalnim stanicama i u osteoblastima kao npr: RANK-ligand, kolonijski stimulirajući čimbenici (CSFs) i IL-6 i IL-11 utječu na stvaranje osteoblasta (12,16). Na kraju sekrecijskog perioda osteoblasti postaju tanki uski jednoslojni sloj stanica ili osteociti. Osteoblasti su glavni pokazatelji koštane izgradnje (15). Po završetku sekretorne funkcije dolazi do apoptoze i osteoblasti postaju ravne stanice ili osteociti. Životni vijek osteoblasta traje od 15 dana do 8

tjedana. Na životni vijek utječu glukokortikoidi koji ubrzavaju programiranu apoptozu. Poznata je smanjena izgradnja kosti pri upotrebi glukokortikoida.

Osteoklasti su koštane stanica odgovorne za koštanu resorpciju. Osteoklasti su velike multinuklearne stanice s puno (4-20) jezgara, vrlo su pokretne stanice i imaju puno izdanaka. Izdanci su vrlo nepravilni i promjenjiva su oblika i debljine. Citoplazma im je obično acidofilna. Još se ne zna da li veći broj jezgara nastaje ponavljanim dijeljenjem jezgre ili spajanjem brojnih stanica (1,2,4,6,9). Elektronskim mikroskopom u smrznutim preparatima se nalazi visoka koncentracija kisele fosfataze u osteoklastima. Osteoklasti se nalaze na koštanoj površini na mjestu aktivne koštane resorpcije, na granici prema kalcificiranoj koštanoj površini i unutar enzimatski nagriženih uleknuća u koštanom matriksu tzv. Howshipovih lakuna. One su nastale kao posljedica vlastite resorptivne aktivnosti. Moguće je pronaći 4-5 osteoklasta na istom mjestu resorpcije, ali obično se nađu jedan do dva (10). U aktivnih osteoklasta od površine kojom dodiruju koštani matriks odlaze nepravilni, često razgranati izdanci koji čine tzv. nabrani rub. Taj rub znatno povećava aktivnu resorpcijsku površinu i ujedno obuhvaća male čestice koje razgrađuju enzimima (11). Kontakt osteoklasta s matriksom se odvija pod djelovanjem intergrinskih receptora najčešće ($\alpha V \beta 3$, $\alpha V \beta 5$ i $\alpha 2 \beta 1$), koji se vežu za specifične dijelove proteina matriksa, pod utjecajem specifičnih signalnih molekula koje pojačavaju adheziju i staničnu pokretljivost. To su: c-Src, Pyk2, Cbl, gelsolin) (12). Naborana citoplazmatska membrana sadrži proteine koji su nađeni i na lizosomima a imaju elektrogene protonske ATP-aze kao i specifične kloridne kanale (ClC 7) odgovorne za acidifikaciju resorbirajućeg ekstracelularnog prostora (13). Bazolateralna strana plazmatske membrane osteoklasta je bogata Na^+ , K^+ ATP-aznom pumpom, HCO_3^-/Cl^- izmjenjivačima i Na^+/H^+ izmjenjivačima kao i brojnim ionskim kanalima (31,33). Membrana proizvodi RANK, receptor za RANKL i stimulirajući faktor makrofaga (M-CSF) koji su odgovorni za diferencijaciju osteoklasta, te kalcitoninski receptor odgovoran za brzinu inaktivacije osteoklasta (46). Citoplazmatski izdanci su naborani s vidljivom izolacijskom zonom. Izolacijska zona odvaja naboranu granicu od ekstracelularnog prostora i služi kao izolator za prostor u kojem se odvija otapanje kosti pod utjecajem osteoklasta. Karakteristični enzimski marker za osteoklast je kiselina tartarat rezistentna fosfatidaza (TRAP) (47). Prekursori osteoklasta potječu iz matičnih hematopoetskih stanica koštane srži. Razvoj u potpuno funkcionalni osteoklast zahtjeva prisutnost kalcitoninskih receptora, ugljikove anhidraze, kao i

brojnih drugih lokalnih faktora uljučujući i prisutnost stromalnih stanica i osteoblasta (48). Članovi TNF obitelji i TNF receptora su RANK i RANKL koji su glavni regulatori djelovanja osteoklasta. RANKL protein koji se nalazi na receptorima osteoblasta aktivira NK (natural killer) - κ B ligand, koji djeluje kao receptor koji ineterferira s receptorima aktivatora NK- κ B (RANK) receptora, na prekursoru osteoklastnih stanica i stimulira osteoklastogenezu (49, 50).

Postoji još jedan kompetitivni receptor, osteoprotegerin (OPG) koji se nalazi na stanicama osteoblasta i koji svojim djelovanjem kontrolira osteoklastogenezu (50).

Mnogu citokini utječu na aktivnost osteoklasta i na koštanu resorpciju kao proinflamatorni citokini IL-1 i IL-6 te TNF. Dušični oksid (NO) je drugi endogeni medijator koji kompleksno djeluje na osteoklastnu funkciju. Neki od citokina tipa IL-1 i interferon-gamma (IFN- γ) tijekom resorpcije mogu posredovati u proizvodnji NO. Poznato je nekoliko izoformi sintetaze dušičnog oksida (NOS). Jedna od njih (iNOS) koju mogu potaknuti citokini, a može biti inhibirana glukokortikoidima. Poznat efekt glukokortikoida na kost (51).

1.5.1. Porijeklo i uništavanje osteoklasta

Osteoklasti potječu iz stanica monuklearno fagocitne linije. Za njihovu diferencijaciju je potreban transkripcijski faktor PU-1 i MiTf u ranim stadijima prisutan u prekursorima stanica mijeloidne loze. Postojanje M-CSF aktivira stanice monocitne linije i osigurava njihovu proliferaciju i pojavu RANK receptora. U tom stadiju mora biti prisutan i RANKL porijeklom iz stromalnih stanica da omogući proces daljnje diferencijacije. U ovoj fazi moraju postojati i TRAF6, NF κ B i c-Fos, svi kasniji efektori signalizacije RANK-a. Iako ova diferencijacija nastaje u ranom promonocitnom stadiju, monociti i makrofagi iz svoje osnovne linije mogu postati osteoklasti pod utjecajem pravih poticaja (47-49).

Unatoč mononuklearno fagocitnom porijeklu, membrana osteoklasta izlučuje različite markere koji nemaju Fc i C₃ receptore. Unatoč sličnom mononuklearnom fagocitu, osteoklast je bogat nespecifičnom esterazom, sintetizira lizosome i CSF-1 receptore. Zbog manjka receptora proizvedena monoklonalna antitijela prepoznaju osteoklaste ali ne i makrofage. Osteoklasti, nasuprot makrofagima proizvode milione kopija receptora RANK-a, kalcitonina i vitronektina (intergrin α V β 3) (48). Iako postoje

mišljenja, da je upitno postojanje receptora za paratiroidni hormon, estrogen ili vitamin D, najnovija istraživanja ukazuju, da se apoptoza osteocita, događa po završetku ciklusa resorpcije, pod utjecajem estrogena. To moguće i objašnjava pojačanu koštanu reapsorbciju poslije gonadektomije ili menopauze (52).

1.5.2. Koštano remodeliranje

Koštano remodeliranje se uglavnom odvija na endostalnoj koštanoj površini. Uključuje rast kosti i pregradnju kosti. Volumen kortikalne kosti je reguliran endostalnom resorpcijom i periostalnom apozicijom. Periostalna apozicija povećava dijametar kosti tijekom života. Gubitak kosti počinje oko 40. godine po mnogim studijama i postoji ubrzanje u koštanom propadanju 5-10 god. poslije menopauze. Kasnije je gubitak sporiji (53). Gubitak kortikalne kosti je glavni predisponirajući faktor prijeloma kuka koji nastaje u starijoj dobi. Neke studije pokazuju da pad koštane mase nastaje i prije menopauze (54). Riggs i Melton smatraju da je ubrzani gubitak kancelozne kosti koji se događa tijekom postmenopauze, manji od kortikalnog. Pri tome ne dolazi samo do stanjenja koštanih površina nego do kompletne perforacije i fragmentacije trabekula (55). U kortikalnoj kosti resorpcija je modulirana fokalnom osteoklastnom resorpcijom na koju utječu lokalni hormonalni faktori iz stanica koštane srži i mikrookoliša, uključujući koštane stanice i pomoćne stanice.

Procesi izgradnje i razgradnje kosti se uzduž koštane površine ne događaju nasumce. Procesi stvaranja i rasta kosti su sudionici mehanizma koštane pregradnje u kojem je stara kost zamjenjena novom. Kod normalne odrasle osobe, po završetku rasta i razvoja, izgradnja kosti se događa samo na onim mjestima gdje je kost bila prethodno razgrađena. Proces remodeliranja se odvija tako da se odstranjena kost za vrijeme resorpcije postepeno zamjenjuje stvorenom kosti tijekom procesa izgradnje. Dolazi do kuplovanja tj. nakupljanja osteoblasta i njihovih progenitornih stanica posredovanjem čimbenika rasta sličnih inzulinu, IGF-1, IGF-II, TGF- β (32-49). H. Frost je prvi dao detaljan opis slijeda događanja tijekom remodeliranja i nazvao to Aktivacijsko – resorpcijsko- formacijska jedinica (ARF). Za vrijeme intremedijarne faze između resorpcije i stvaranja kosti (reverzne faze), uočene su, na mjestu remodeliranja neke makofazima slične netipične mononuklearne stanice:

vidljivo je da dolazi i do formiranja cementne linije koja čini granicu resorpcije i ugrađuje cement iz stare u novu kost.

Osteoklasti luče metaloproteinaze kao kolagenazu i želatinazu. Osteoklasti zakiseljuju ekstracelularni matriks djelovanjem protonskih pumpi. Najnovija genetska istraživanja pokazuju da je elektrogena protonska pumpa ATP-aze srodna ali ipak različita s tubularnim staničnim lizosomima bubrega. U ekstracelularnom matriksu nastaje visoka koncentracija protona posredovanjem ugljikove anhidraze, ATP i CO₂ iz mitohondrija. Na apikalnoj strani osteoklasta se otvaraju kloridni kanali (ClC-7) koji služe za prevenciju hiperpolarizacije izazvanu masovim izlaskom pozitivno nabijenih protona preko V-ATPaze. Na bazolateralnoj membrani se odvija izmjena iona bikarbonata za kloride čime se sprječava alkalinizacija citosola i omogućuje prisutnost klorida u ionskim kanalima na neravnoj granici. Bazolateralna Natrijska pumpa može biti uključena i sekundarni aktivni transport iona kalcija i protona vezani uz Na⁺/Ca⁺² izmjenjivač te zamjenu vodikovih iona. Zakiseljavanjem ekstracelularni koštani prostor postaje pogodan za djelovanje lizosomalnih enzima i za razgradnju kosti. Niski pH otapa kristale izložene u matriksu, a enzmi tada pri optimalnom pH razgrađuju komponente matriksa. Još uvijek je u potpunosti nepoznat pokretač svih procesa remodeliranja kosti. Početak je svakako aktivacija osteoklasta, koja nastaje procesima, koji se odvijaju između integrina i stanične membrane osteoklasta, matriksa aminokiselina i svega gore navedenog. Ostaci ove izvanstanične razgradnje se u potpunosti apsorbiraju i transportiraju kroz stanicu (transcitoza) te otpuštaju, oslobađaju ovapnjelu osnovnu tvar i uklanjaju otpatke koji nastaju tijekom resorpcije kosti. Kronološki gledano kristali se odvajaju od kolagena (nekolageni proteini) i otapaju u kiseloj okolini. Ostatna kolagena vlakna se razgrađuju zbog aktivacije latentne kolagenaze i zbog djelovanja katepsina pri niskom pH. Klinički to objašnjava zašto koštana resorpcija može utjecati na nivo kalcija i anorganskih fosfata u plazmi i zašto se koncentracija hidroksiprolina u urinu koristi kao indirektni pokazatelj stupnja koštane razgradnje kod ljudi, (kolagen tip1 je jako bogat hidroksiprolinom) (17,20).

Čini se da kompletni remodelacijski ciklus na svakom mjestu traje između 3 i 6 mj. Iako je kortikalna kost anatomski različita, remodeliranje se odvija po istom biološkom principu. U svakom sistemu se formira lamelarna kost s tipičnom koštanom strukturom i Haversovim sistemom.

1.6. KOŠTANI RAZVOJ I RAST

Kost nastaje na dva načina: izravnom mineralizacijom matriksa koji su izlučili osteoblasti (intramembranozno okoštavanje) ili odlaganjem koštanog matriksa na mjestu prethodnog hrskavičnog matriksa (enhondralno okoštavanje). Na oba načina najprije nastaje primarno koštano tkivo koje se ubrzo zamjenjuje sekundarnim. Tijekom rasta kosti pojavljuju se jedno uz drugo primarno koštano tkivo, područja resorpcije i područja lamelnog koštanog tkiva. Proces traju tijekom cijelog životnog vijeka i nešto su usporeniji u starijoj životnoj dobi (6,7). Tijekom endohondralne osifikacije dolazi do kondenzacije mezenhimalnih stanica koje čine hrskavični model. Poslije hipertrofije hondrocita i mineralizacije hrskavičnog matriksa pod djelovanjem osteoblasta i razvijaju se primarni i sekundarni centri osifikacije. U zreloj odrasloj kosti mjesta rasta su potpuno resorbirana i duž cijele kosti postoji šupljina.

1.6.1. Intramembranozno okoštavanje

U intramembranoznoj osifikaciji grupa mezenhimalnih stanica pod utjecajem lokalnih faktora rasta (FGFs, BMPs, Hedgehogs, PTHrP, i transkripcijskih faktora Runx2 i Osterix) formira zgusnuća u jako vaskulariziranom području embrionalnog vezivnog tkiva i pretvara ga direktno u preosteoblaste, kasnije i u osteoblaste (21,23,26,28). Ove stanice sintetiziraju koštani matriks sa slijedećim karakteristikama: (i) kolagena vlakna nisu pravilno poslagana nego su razbacana u snopove, (ii) osteociti su veliki i prilično brojni, (iii) kalcifikacija je odgođena i ne događa se po pravilnom rasporedu nego na nepravilnim pojedinačnim mjestima. Ovaj tip kosti se zove mrežasta, spužvasta kost.

Ishodišno mjesto okoštavanja u zgusnutom mezenhimu se zove primarno središte okoštavanja. U središtu okoštavanja nekoliko gredica daje kosti spužvast izgled. Stanice zgusnutog mezenhima se dijele i nastaju novi osteoblasti i tako raste središte okoštavanja.

Prema periferiji mezenhimalne stanice nastavljaju diferencijaciju po istom principu. Krvne žile koje su ugrađene između isprepletenih koštanih trabekula formiraju hematopoetsku koštanu srž. Kasnije se mrežasta kost remodelira po principu ARF sekvence i progresivno se zamjenjuje zreloom lamelnom kosti.

1.6.2. Enhondralno okoštavanje

Enhondralnim okoštavanjem nastaju sve duge i kratke kosti. Okoštavanje teče u dvije faze. U prvoj fazi pod djelovanjem lokalnih faktora rasta, mezenhimalne stanice se razvijaju i diferenciraju u prehondroblaste a nakon toga u hondroblaste umjesto u osteoblaste. Ove stanice izlučuju hrskavični matriks. Kao i osteoblasti hondroblasti postaju sve prepunjeniji vlastitim matriksom. Smješteni su unutar lakuna i zovu se hondrociti. Ipak, suprotno od osteocita, nastoje proliferirati neko vrijeme i tako proizvode hrskavicu koja je slična gelu. U drugoj fazi nastaje osteogeni pupoljak koji sadržava koštane prastanice. Na periferiji hrskavice (perihondriju), mezenhimalne stanice nastavljaju proliferaciju i diferencijaciju. To se zove apozicijski rast. Drugi oblik rasta se događa u hrskavici pri sintezi novog matriksa između hondrocita (intersticijski rast). Glavne molekule odgovorne za regulaciju diferencijacije hondrocita, formiranje i ekspanziju površina rasta su nedavno identificirane kao Indian Hedgehog (Ihh) ili PTHrP stanice (57). Po tom modelu, Ihh koordinira proliferaciju i diferencijaciju hondrocita kao i osteoblasta (58). Sintetizira ih iz prehipertrofičnih hondrocita i inducira proizvodnju PTHrP iz perihondralnih stanica. Obrnuto PTHrP djeluje i održava proliferaciju hondrocita. Kad padne nivo PTHrP u visoko diferenciranim hondrocitima, proizvodi se Ihh, koji ubrzava procese hipertrofije i obratno; koristeći mehanizam povratne sprege inducira se proizvodnja PTHrP na krajevima kosti (59). Područje u dijafizi gdje započinje okoštavanje zove se primarno središte okoštavanja. Brzim rastom u uzdužnom smjeru ono se protegne na cijelu dijafizu, koja se tada sastoji samo od koštanog tkiva. Širenje primarnog središta okoštavanja prati i širenje periostalnog koštanog ovratnika, koji također raste prema epifizama. Od samog početka nastajanja središta okoštavanja djeluju osteoklasti i resorbiraju kost u unutrašnjosti središta. Tako se stvara sržna šupljina, koja se izduljuje i prati napredovanje okoštavanja prema budućim epifizama.

U kasnijim fazama razvoja pojavljuju se u središtu svake epifize sekundarna središta okoštavanja. U istoj kosti ne nastaju sva središta istodobno. Funkcija sekundarnih središta slična funkciji primarnog središta, ali je smjer njihova rasta radijalan, a ne uzdužan. Pošto zglobna hrskavica nema perihondrij na epifiznim krajevima se ne stvara koštani ovratnik. Kada koštano tkivo nastalo u sekundarnim središtima okoštavanja ispuni epifiznu, hrskavično tkivo ostaje ograničeno na dva mjesta: zglobna hrskavica koja traje cijelog života i ne sudjeluje u stvaranju koštanog

tkiva i epifizna hrskavica ili epifizna ploča koja povezuje epifiznu s dijafizom. Tijekom rasta epifiznu hrskavicu stalno nadomješta koštani matriks koji nastaje u dijafizi. Po završetku rasta epifizne hrskavice, kost više ne raste u duljinu.

Rast dugih kostiju je složen proces. Epifize se povećavaju zbog radijalnog rasta hrskavice, prije enhondralnog okoštavanja. Tako se povećava epifizno spužvasto koštano tkivo. Dijafiza ima u početku oblik koštanog cilindra. Zbog bržeg rasta epifiza završni se dijelovi dijafize proširuju pa nastaju dva dijafizna lijevka (metafize), koji su međusobno odvojeni cilindričnim dijafiznim dijelom. Cilindrični dio dijafize se produljuje zbog osteogene djelatnosti epifizne hrskavice. Periostalnim stvaranjem kosti na vanjskoj strani koštanog ovratnika kost raste u širinu (zadebljava). Istodobno se kost odstranjuje s unutrašnje površine pa se proširuje sržna šupljina kosti. Rast u širinu je rezultat odlaganja nove membranozne kosti ispod periosta, a odvija se kontinuirano tijekom života.

1.7. MARKERI KOŠTANE PREGRADNJE

Klinička upotreba u praćenju procesa remodeliranja kosti je bitna ali nije strogo specifična. Na nju mogu utjecati dob, spol, rasa i svi drugi hormoni, čimbenici rasta, proteini koštanog matriksa i ostali čimbenici koji interferiraju s koštanim metabolizmom. Koštani markeri su povišeni kod djece radi ubrzanog koštanog rasta, kod žena u postmenopauzi radi ubrzane razgradnje kosti. Efekt spola je razvijeniji s dobi, u djetinjstvu je razlika mala i neznčajna, dok je kod odraslih značajna. Bitno je poznavati rasni utjecaj na nivo koštanih markera, kao i sve ostale faktore radi preciznije interpretacije njihovih vrijednosti.

Koštani markeri su najviši u doba rođenja i prve godine života u usporedbi s periodom ostalog dijela djetinjstva. Urinarni piridinolin (U-PYD), deokspiridinolin (U-DPD) i N telopeptidi tipa I kolagena (U-NTX) kao markeri resorpcije kosti su nekoliko puta veći pri rođenju nego u starije djece i odraslih (60). Biokemijski markeri za vrijeme rasta su odraz promjena pri brzom skeletnom rastu i ubrzanom koštanom modeliranju. Nakon skoka pri rođenju i 1. godini života markeri stabiliziraju svoj nivo do prije puberteta (61, 62).

U prepubertalnom stadiju nivo biokemijskih markera izgleda jednak i kod dječaka i kod djevojčica ali za vrijeme puberteta poveća se otprilike dvije godine ranije kod djevojčica (65). Marker izgradnje i razgradnje kosti i osteokalcin i

betacross laps se povećavaju ranije kod djevojčica u odnosu na dječake. U kasnijem pubertetu se kod djevojčica događa i raniji pad vrijednosti markera (64). U ranijim stadijima puberteta djevojčice imaju viši nivo markera pregradnje, u kasnijim stadijima obratno. Iako su dječaci izloženi sporijem povećanju koštane pregradnje u odnosu na djevojčice, njihovi markeri se povećavaju postepeno i duže ostaju viši do završetka ukupnog koštanog rasta. Rasna pripadnost također utječe na nivo markera koštane aktivnosti - ovisno o veličini skeleta- kod crne djece mogu biti markeri resorpcije, mjereni piridolidinima, smanjeni, kao i markeri izgradnje, mjereni osteokalcinom (67). Razlozi nisu u potpunosti jasni.

Adolescencija je period u kojem se postiže najveći koštani i mineralni rast. Marker su refleksija ovakvih događanja (63). Marker su viši u srednjem dijelu puberteta nego nešto kasnije (63, 64). Radovi pokazuju da se koštana AF PICP i osteokalcin povećavaju za vrijeme puberteta s najvišim vrijednostima između 2. i 3. Tannerovog stadija i da se postepeno smanjuju tijekom daljnjeg pubertalnog razvoja (64, 65). Marker resorpcije se ponašaju isto kao marker izgradnje ovisno o dobi. PICP je bio povećan 3x u odnosu na referentne vrijednosti za odrasle (65, 66). Poslije puberteta markeri koštane pregradnje budu još neko vrijeme lagano povišeni do nivoa završetka rasta. To omogućava povećanje koštane mase do zatvaranja epifiznih pukotina.

1.8. KOŠTANI RAST U DJETINJSTVU I ADOLESCENCIJI

Unatoč dobro definiranim prametrima koštane homeostaze u odraslih, evidentno je, da je poznato malo činjenica o mineralnom metabolizmu, homeostazi kalcija i povećanju kosti tijekom djetinjstva i adolescencije. Djetinjstvo i adolescenciju karakterizira rast kosti u dužinu kao i promjene u veličini i izgledu skeleta. Genetski faktori djeluju na brzinu sazrijevanja i na konačno dosegnutu razinu rasta i razvoja. Krivulje rasta visine i težine konstruirane su na temelju statistički obrađenih podataka velikog broja zdrave djece kojima se prati korelacija tjelesna visina i težina s kronološkom dobi. Koštana masa se dramatično povećava za vrijeme perioda rasta. Poznato je da je količina kosti stečena u tom periodu bitna odrednica rizika prijeloma kosti u kasnijoj dobi. Važno je odrediti fiziološke varijacije količine koštane mase

tijekom djetinjstva i adolescencije jer bi time mogli na vrijeme identificirati pojedince s većim rizikom za osteoporozu i ostale bolesti koštanog metabolizma (60).

Otkriće i razvitak preciznih neinvazivnih metoda mjerenja koštanog mineralnog sadržaja (BMC) i mineralne koštane gustoće (BMD) je značajno poboljšalo mogućnost proučavanja utjecaja genetskih faktora i faktora okoline na postizanje koštane mase. Pedijatrijske aplikacije na standardne metode mjerenja su direktni pokazatelji postignute koštane gustoće u tom periodu.

1.8.1. Akumulacija kosti i vršna koštana masa

Masa skeleta se poveća od 70-95 grama pri rođenju do 2400-3300 grama kod mladih muškaraca i žena (61). Ova masa se postiže longitudinalnim rastom te kombinacijom izgradnje i razgradnje kosti. Proces se događaju pojavom različitih mjesta primarne i sekundarne osifikacije na različitim mjestima. Longitudinalne studije povećanja ukupne koštane mase pokazuju da je porast najveći i najbrži tijekom puberteta i da se oko 25% vršne koštane mase (PBM) postiže tijekom dvogodišnjeg perioda rasta do postizanja najviše visine. Završetkom rasta djevojčice i dječaci postignu 90% kompletne stature, ali samo 57% ukupne koštane mase odraslih (62). Ostatak BMC do 90% se postiže do 18. godine života. Ljudski skelet sadrži oko 85% kortikalne i 15% kancelozne kosti i studije pokazuju da se količina kosti dobivena tijekom rasta, kao i ona koja se gubi u starosti odvija različitim procesima između obje vrste kosti (63,64). Gustoća kancelozne kosti je pod značajnim utjecajem hormonalnih i drugih metaboličkih faktora udružena sa spolnim razvojem u kasnijoj adolescenciji (65). U prosjeku se koštana gustoća kralješnice tijekom puberteta poveća i kod djevojčica i kod dječaka za 13 %. Po završetku puberteta, gustoća na kralješnici slabije korelira s dobi, spolom, visinom, težinom, tjelesnom površinom ili indeksom tjelesne mase (BMI) (65). Porast gustoće kancelozne kosti tijekom kasnijih pubertalnih stadija nastaje kao posljedica zadebljanja trabekula i koštanih gredica. Nije poznat faktor koji definira količinu stupnja povećanja kancelozne kosti u kasnom pubertetu. Razložno je za pretpostaviti da masa promjena koje se odvijaju tijekom puberteta, kao što su npr.: ubrzani koštani rast, porast veličine tijela i ukupne koštane mase kao i djelovanje spolnih hormona zajedno doprinose ukupnom povećanju BMC-a. Neke od ovih posljedica mogu nastati kao rezultat promjene u ukupnoj količini proteina i metabolizma kalcija koji je

pod utjecajem spolnih hormona ili mogu biti i posljedica kaskadnih događanja izazvanih povećanjem koncentracije hormona rasta i inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1) koji se povećavaju pod utjecajem spolnih hormona (66).

Još nije definirano koja vrijednost postignute koštane mase je adekvatna za koju dob, na različitim dijelovima kostura. Različito je vrijeme postizanja vršne koštane mase i u aksilarnom i apendikularnom skeletu između muškaraca i žena. Sve napravljene studije su koristile različite metode mjerenja koštane mase. U aksijalnom skeletu vršna koštana masa se može postizati do kraja druge životne dekade. Studije mjerenja koštane gustoće žena metodom kompjuterizirane tomografije (CT), pokazale su da se gustoća i veličina vertebralne kosti povećava i doseže svoj „peak“ po završetku spolne i koštane zrelosti (65,67). Potvrđuju i podatke da gubitak trabekularne kosti počinje najranije u trećoj životnoj dekadi bez promjene u poprečnoj presječnoj dimenziji vertebralnog tijela od 15. do 90 godine starosti (68,69). Neke studije su pokazale povećanja poprečno presječene koštane površine kod muškaraca i po završetku longitudinalnog rasta, dok neke studije nisu pokazale nikakve promjene. Postoji kontroverze o mogućnosti trajnog povećanja koštane mase tijekom cijelog života (69).

Manjak estrogena jedan je od glavnih čimbenika koji utječe na smanjenje koštane mase što je posebno izraženo u postmenopauzalnih žena. Međutim, i studije na muškarcima su pokazale da i u njih koncentracija estrogena bolje korelira s BMD nego koncentracija testosterona (70). Točan mehanizam djelovanja estrogena na kost još nije u potpunosti razjašnjen. 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-I), osteoprotegerina, transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), a smanjuje sintezu interleukina 1 i čimbenika tumorske nekroze alfa.

Gubitak koštane mase povezan sa starenjem može biti i posljedica povećane koncentracije paratiroidnog hormona (PTH). Naime, i u muškaraca i u žena u starijoj su dobi zabilježene više vrijednosti PTH (71). Povišena koncentracija PTH je posljedica smanjene reapsorpcije kalcija u tubulima bubrega i smanjene apsorpcije kalcija u crijevu. U starijoj je dobi vrlo često nazočna rezistencija na vitamin D, kao i deficit vitamina D uslijed smanjenog izlaganja sunčevim zrakama. Isto tako smanjena je i aktivnosti 1- α hidroksilaze u bubregu, a time i sinteza aktivnog oblika vitamina D,

što sve doprinosi porastu koncentracije PTH. Porast koncentracije PTH koji nastaje s dobi, u žena može biti i indirektna posljedica manjka estrogena (70).

Osim gore navedenih čimbenika, ubrzanom gubitku koštane mase mogu doprinijeti još i pušenje, uzimanje alkohola i imobilizacija, te brojne bolesti i mnogi lijekovi od kojih su najčešći navedeni u tablici 1.

Tablica 1. Najčešće bolesti i lijekovi koji su uzrok smanjenja BMD

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| <i>Bolesti</i> | |
| Hipogonadizam | Zloćudne bolesti |
| Tireotoksikoza | Hiperparatiroidizam |
| Osteogenesis imperfecta | Hiperprolaktinemija |
| Tip 1 šećerne bolesti | Anorexia nervosa |
| Malapsorpcijski sindrom | Bolesti hepatobilijarnog sustava |
| Upalne bolesti crijeva | Reumatoidni artritis |
| Zatajenje bubrega | Transplantacija organa |
| Mastocitoza | |
| <i>Lijekovi</i> | |
| Glukokortikoidi | |
| Antikonvulzivi | |

1.8.2. Vršna koštana masa

Količina kosti u bilo kojem trenutku života rezultanta je izgradnje kosti tijekom intrauterinog rasta, djetinjstva i adolescencije, te gubitka kosti tijekom starenja. Brojni su čimbenici koji utječu na vršnu koštanu masu (PBM), a njihovo bi nam razotkrivanje omogućilo primjenu preventivnih mjera koje bi povećale vrijednosti PBM do genetski zadanog maksimuma. Točna dob u kojoj se postiže PBM ovisi o dijelu skeleta i spolu. Čini se da se u aksijalnom skeletu PBM postiže pri kraju drugog desetljeća života (72), dok podaci za apendikularni skelet nisu jednoznačni.

Longitudinalne studije u kojima je korištena dvoenergetska apsorpcijometrija x-zraka (DXA) pokazale su da se PBM u vratu bedrene kosti, jednako kao i u

kralježnici, postiže pri kraju puberteta (73), i to znatno ranije u žena nego u muškaraca. Porast koštane mase osobito je velik u vrijeme adolescencije tako da se oko 25% PBM stekne tijekom dvogodišnjeg perioda ubrzanog rasta (74).

Istraživanja su nadalje pokazala da se $\frac{3}{4}$ varijacije u PBM može pripisati nasljednim čimbenicima, a ostatak čimbenicima okoline kao što su prehrana i fizička aktivnost. Djelovanje genetskih čimbenika ovisi o dobi i dijelu skeleta; izraženije je u mlađoj dobi, te na kralježnici (75). Spoznaje o djelovanju gena na PBM temelje se na istraživanjima koja su ukazala na nižu koštanu masu u djevojaka čije majke boluju od osteoporoze (76), kao i muškaraca i žena čiji prvi rođaci imaju osteoporozu (77). 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.

1.9. GENETSKI UTJECAJ NA KOST

1.9.1. Genetika osteoporoze

Nasljedstvo je važna odrednica koštane mase. Studije blizanaca, promatranja koštane gustoće parova majka djeteta, braće i sestara, blizanaca pokazuju da se genetski utjecaj na koštanu gustoću kreće od 60 do 80% (78-80). Veličina genetskog utjecaja ovisi o dobi i dijelu skeleta. Viša je kod mlađih nego kod starijih i značajnija na kralježnici u odnosu a ekstremitete (81-83).

Prilogu genetskom utjecaju na kost doprinose studije koje su pokazale smanjenu koštanu masu kod djevojčica čije su majke imale osteoporozu u odnosu na kontrolnu grupu (80,81,83). Manja koštana masa nađena je i kod muškaraca i kod žena čiji su najbliži rođaci imali osteoporozu. Nedavno su pronađeni geni kandidati za određivanje koštane mase (Tablica 1.1).

Tablica 1.1. Geni-kandidati u patogenezi osteoporoze

| Ime gena | Simbol |
|---|--|
| Kalciotropni hormoni i receptori Receptor za vitamin D Receptor za estrogen tip 1 i 2 Receptor za kalcitonin Paratiroidni hormon Receptor za paratiroidni hormon 1 Kalcij sensing receptor Aromataza Receptor za glukokortikoide | VDR ESR 1 i 2 CALCR PTH PTHR1 CASR ARO GR |
| Citokini, čimbenici rasta i receptori Transformirajući čimbenik rasta beta 1 Čimbenik rasta sličan inzulinu Interleukin-6 Interleukin 1 β Antagonist receptora za interleukin 1 Tip 2 receptora za čimbenik nekroze tumora Koštani morfogogenetski protein 4 | TGF β 1 IGF-I IL6 IL-1 β IL-1 RA TNFR2 BMP-4 |
| Koštani matriks Alfa 1 lanac tipa 1 kolagena Osteokalcin Kolagenaza α HS2 glikoprotein | COLIA1 |
| Ostalo Apolipoprotein E Reduktaza metilen tetrahidrofolata P57 Kip Glavni sustav tkivne snošljivosti PPAR γ Werner Helicase gene | APOE MTHFR HLA |

Površena je i prisutnost polimorfizma gena vitamin D receptora (VDR) gdje je Bsal restrikcija povezana s BMD kod prepubertalnih i adolescentnih djevojaka (84). Djevojčice s BB genotipom imaju značajno niži BMD SD skor nego djevojčice s Bb i bb genotipom (84). Nasuprot tome polimorfizam u početku kodona na VDR genu, detektiran s FokI restrikcijskim enzimom nije povezan s BMD niti na jednom mjestu kod prepubertalnih djevojaka (85). Povezanost između femoralnog i vertebralnog BMD kod VDR genotipa s ApaI i BsmI restrikcijskog fragmenta je dokazana CT-om kod prepubertalnih Američkih djevojaka i djevojaka Hispaničkog porijekla (86). U toj studiji, djevojke s aa i bb genotipom su pokazale statistički značajno višu volumetrijsku vrijednost BMD nego djevojke s ostalim genotipovima i na kralješnici i na bedrenoj kosti. Polimorfizmi na Sp1- vežućem mjestu gena odgovornog za kodiranje kolagena tip Ia1 su dokazali različitost u vertebralnom BMD u kohorti prepubertalnih djevojaka (87). Nasuprot tome u Norveškoj studiji, nije potvrđena povezanost VDR genotipa na BsmI sekvenci na koštanoj gustoći podlaktice kao ni na količini povećanja BMD kod dječaka i djevojčica (88).

Razlike u PBM ovise o rasi. Poznato je da su prevalencija osteoporoze kao i incidencija prijeloma značajno manji u crnaca nego u bijelaca što se pripisuje razlikama u koštanoj masi u odrasloj dobi. Postoje li takve razlike i u mlađoj dobi još je uvijek predmet istraživanja. Naime, istraživanja koja su koristila metodu DXA polučila su kontroverzne rezultate. Neka su ukazala na višu koštanu masu u djece pripadnika crne rase (89), dok druga nisu našla razlike između rasa (90). Ipak, istraživanje u kojem je korištena metoda CT pokazalo je značajno veću gustoću kosti u aksijalnom skeletu u adolescenata crne rase (90). Ove razlike nastaju u kasnom stadiju puberteta i perzistiraju tijekom cijelog života. S druge strane, u apendikularnom skeletu nije bilo razlike u gustoći kortikalne kosti, no, veće kosti koje su nazočne u pripadnika crne rase imaju mehaničku prednost jer su čvršće i stoga manje lomljive (90). Istraživanja u adolescenata žute rase pokazala su da oni imaju sličnu koštanu masu kao i pripadnici bijele rase, a značajno nižu od crnaca (91).

Većina istraživanja, bazirana na apsorpcijskim metodama određivanja koštane gustoće, potvrđuju da predstavnici crne rase imaju u djetinjstvu i pubertetu veću koštanu gustoću u odnosu na bijelu (91-93). Bitno je napomenuti da ovo vrijedi samo za Američku populaciju. Poznato je da djeca crne rase koja žive u Gambiji imaju manju koštanu masu u odnosu na Britansku djecu (94); dok djeca crne rase Južne Afrike imaju istu koštanu masu kao bijela (95). Studija u Americi u kojoj je korištena

dvoenergetska apsorpciometrija x-zraka (DXA) za mjerenje BMD kralješnice kod 218 djece pokazala je da nije bilo razlike po spolu, dobi, rasi ili načinu života nego po Tannerovom stadiju razvoja i težini (96). Pedijatrijske studije rađene metodom kompjuterizirane tomografije (CT) potvrdile su da neovisno o spolu, rasa ima značajne i različite utjecaje na gustoću i veličinu kosti i u aksijalnom i apendikularnom skeletu (91). U aksijalnom skeletu je potvrđena veća koštana gustoća kancelozne kosti u kralješcima „crnih“ adolescenata u odnosu na bijele. Razlika nastaje akumulacijom veće koštane mase u kasnijim stadijima puberteta i održava se tijekom života (92). Metodama mjerenja koštane gustoće CT nađena je ista koštana gustoća kancelozne kosti i kod crne i bijele djece prije puberteta kao i povećanje tijekom puberteta; međutim, povećanje između prepubertalne i postpubertalne koštane mase je značajno veće kod djece crne rase u odnosu na bijelu (34% prema 11%) (91). Promjene u poprečnoj presječnoj dimenziji vertebralnog tijela nisu postojale. Ovo teoretski pokazuje da strukturalna osnova za manju snagu vertebralne kosti kao i za veću pojavu prijeloma kod bijelaca leži u činjenici da imaju manju kanceloznu koštanu gustoću. Unatoč tome, u apendikularnom skeletu, promjene u poprečnoj presječnoj dimenziji bedrene kosti ne pokazuju nikakve razlike ni u veličini koštane površine ni u gustoći (91). Povećanje u poprečnoj presječnoj dimenziji bedrene kosti je potvrđeno kod sve djece; ovisno o visini, težini i drugim antropometrijskim parametrima (91).

Istraživanja kod Azijata i Hispanika, pokazuju da njihova djeca imaju istu koštanu masu kao bijelci, a značajno nižu od crnaca (92,98). Razlike u veličini, količini i gustoći kosti djece su uglavnom rezultat konstitutivnih rasnih razlika između ne Hispanika, Hispanika i Azijata (92,98). Povećanje koštane mase tijekom puberteta najviše doprinosi pojavi veličine vršne koštane mase (PBM), koja je opet glavni predskazatelj rizika za prijelom i osteoporozu u starijoj životnoj dobi.

Istraživanja provedena DXA-om i CT pokazuju da je morfološki raspored prenošenja opterećenja za sile vlaka jednak od djetinjstva do starosti, i da pokazuje nepromjenjivost kroz vrijeme. Isti raspored je potvrđen i kod premenopausalnih majki i njihovih prepubertalnih kćeri.

Nadalje, denzitometrijske vrijednosti koštane gustoće kćeri nakon 2 godine su pokazale značajnu korelaciju s početnim mjerenjima. Istovremeno, longitudinalna CT mjerenja poprečno presječenih područja i kralješaka i bedrene kosti, kao i gustoća kancelozne kosti, kod zdrave djece potvrđuju da takva mjerenja u ranoj fazi puberteta

moгу biti pokazatelji veličine kosti nakon spolnog sazrijevanja. Podjelom početnih vrijednosti u kvartile rasta prati se linearni odgovor kroz pubertetski status za svaku kvartilu. Ovim metodama se može identificirati onu djecu koja su genetski sklona da razviju nisku vršnu koštanu masu i osteoporozu kasnije u životu. Ovo bi trebao biti jedan na od glavnih ciljeva u prevenciji osteoporoze.

1.9.2. α -receptor za estrogen

Estrogen i receptor za estrogen imaju centralnu ulogu u metabolizmu kosti što potvrđuju podaci o smanjenju BMD u žena nakon menopauze, kao i u muškaraca s deficitom aromataze ili mutacijom receptora za estrogen. Gen za α -receptor za estrogen nalazi se na 6q25-27 kromosomu i sadrži 8 egzona. Većina studija je analizirala povezanost BMD i dva polimorfizma unutar introna 1 putem restrikcijskih enzima Xba1 i PvuII, kao i polimorfizma mikrosatelitnog lokusa timin-adenin (TA)_n u promotorskoj regiji. Ovaj je polimorfizam smješten 1174 parova baza ispred prvog egzona i povezan je s BMD.

Meta-analiza objavljenih istraživanja ukazala je na povezanost između XbaI polimorfizma, BMD i prijeloma, tako da su XX homozigoti imali viši BMD i manji rizik prijeloma (99). S druge strane, Langdahl i suradnici su pokazali da je broj ponavljanja sekvence TA u promotorskoj regiji receptora za estrogen udružen s povećanim rizikom osteoporotičnog prijeloma i umjerenim smanjenjem BMD (100).

1.9.3. Receptor za androgen

Učinak testosterona i njegovog metabolita 5 α -dihidrotosterona na kost ostvaruje se vezanjem za receptor za androgen. Stoga bi polimorfizam gena za ovaj receptor mogao utjecati na učinke androgena u ciljnim tkivima. Mikrosatelitna regija citozin-gvanin-adenin (CAG)_n je smještena unutar egzona 1, gena za androgeni receptor koji se nalazi na kromosomu X i kodira poliglutaminski dio aminoterminalne domene receptorskog proteina. Broj ponavljanja sekvence CAG obrnuto je proporcionalno povezan s transkripcijskim odgovorom na testosteron (101). Na

temelju ovih podataka može se pretpostaviti da bi veći broj ponavljanja sekvence CAG mogao biti udružen s manjom BMD.

Sowers i suradnici su utvrdili povezanost između polimorfizma $(CAG)_n$ i BMD u grupi od 261 ispitanica iz SAD (102). U drugom istraživanju koje je uključivalo 110 zdravih muškaraca u dobi 20-50 godina utvrđena je manja koštana masa u osoba u kojih je bio nazočan veći broj ponavljanja sekvence CAG (103). Međutim, ti rezultati nisu potvrđeni u muškaraca starijih od 70 godina (104).

1.9.4. Čimbenik rasta sličan inzulinu

Stimuliranjem funkcije osteoblasta i spriječavanjem degradacije kolagenog matriksa kosti, IGF-I ima jednu od ključnih uloga u metabolizmu koštanog tkiva. Koncentracija IGF-I u serumu je neovisni predskazatelj vrijednosti BMD u lumbalnoj kralježnici i Wardovom trokutu (105). Također, čini se da je u postmenopauzalnih žena koncentracija IGF-I povezana s terapijskim odgovorom na primjenu hormonskog nadomjesnog liječenja (106).

Polimorfizam mikrosatelitne regije citozin-adenin $(CA)_n$, udaljene 1 kilobazu od transkripcijskog mjesta za IGF-I, povezan je sa serumskom koncentracijom IGF-I (107). Izgleda da bi ovaj polimorfizam mogao, također, biti povezan i s BMD (108).

1.9.5. Aromataza

Premda su androgeni glavni spolni steroidi u muškaraca, u zadnjih nekoliko godina više je eksperimentalnih i kliničkih istraživanja ukazalo na predominantnu ulogu estrogena u regulaciji metabolizma kosti u muškaraca. Enzim P450-aromataza je proizvod gena CYP19, čijim djelovanjem iz androgenih prekursora u perifernim tkivima dolazi do sinteze estrogena. Važna uloga ovog enzima u metabolizmu kosti dokazana je u eksperimentalnim istraživanjima s inhibitorima aromataze (108), potom opisom muškaraca s mutacijom gena za aromatazu i posljedičnom osteopenijom, te izostalim zatvaranjem epifiznih pukotina (109). Upravo bi stoga polimorfizam gena CYP19 mogao biti jedan od najvažnijih čimbenika kojim bi se mogla objasniti genetska pozadina niže koštane mase kod djece i osteoporoze u muškaraca.

Unutar črtvrtog introna gena CYP19 se nalazi mikrosatelitni lokus kojeg čini različiti broj ponavljanja sekvence TTTA. Polimorfizam unutar ove regije uzrok je promjena u sintezi estrogena koje mogu rezultirati različitom koštanom masom.

1.10. PEDIJATRIJSKO MJERENJE KOŠTANE MASE

Najčešće korištena radiografska metoda za određivanje koštane mase kod djece i odraslih je dvoenergetska apsorpciometrija x-zraka (DXA). Standardni softver je izrađen za odrasle, kasnije se pokazala potreba za razvojem specijalnih pedijatrijskih softvera. Kod njih pregled traje duže, kooperacija s djecom je kompliciranija, potrebno je duže vrijeme mirovanja pri snimanju i mogu se dogoditi veće greške pri mjerenju (99).

Glavna mjesta na kojim se vrši mjerenje kod odraslih su lumbalna kralješnica, proksimalni dio bedrene kosti i podlaktica. Kod djece postoje značajne različitosti tijekom rasta čak i po kronološkoj dobi, u periodu rasta se s dobi mijenja i veličina i oblik kosti. Za egzaktnu pedijatrijsku studiju se preporuča određivati koštani mineralni sadržaj cijelog tijela (100).

Normativi za DXA vrijednosti variraju od aparata do aparata pa se moraju navesti pri izvođenju istraživanja. Vidljivo je da se vrijednosti izmjerene na različitim skeletnim mjestima povećavaju od djetinjstva do odrasle dobi (73,90,101-104). Preciznost DXA mjerenja u dječjoj dobi je od 0,8% do 2,5% u većini studija (101,105-107). Povezanost između dobi i BMC je predstavljeno polinomialnom krivuljom; gdje je brzo povećanje koštanog sadržaja za vrijeme djetinjstva, praćeno značajnim porastom za vrijeme puberteta i da završava na kraju treće životne dekade (67,73,101,103,104,107,108) .

Mjerenje CT metodom (QCT) se može izvesti na bilo kojem mjestu, prednost metode je što mjeri volumen i gustoću kosti i aksijalnog i apendikularnog skeleta, neovisno o veličini skeleta, čime postaje najpogodnije sredstvo za mjerenje gustoće kod djece (109). Nažalost, CT skeneri su skupi, veliki, nepokretni strojevi koji zahtijevaju skupo održavanje, značajnu opremljenost i tehničku i prostornu i nisu pogodni za masovnu upotrebu. Većina je smještena na radiologijama u bolnicama i nije pogodna za svakodnevnu upotrebu. Ovi nedostaci su doveli do proizvodnje manje skupih perifernih QCT (pQCT) skenera napravljenih isključivo za mjerenja

kosti. Ovi mali skeneri mogu mjeriti samo apendikularnu kost. Količina zračenja je manja nego pri osnovnim CT mjerenjima.

U aksijalnom skeletu QCT se primarno koristi za određivanje kancelozne koštane gustoće (mg/cm^3) kralježaka. Bitno je znati da, kralješci djece sadrže više kosti, a manje masti nego odrasli i zato je i preciznost i osjetljivost QCT pri mjerenju kancelozne kosti bolja kod djece nego kod odraslih. Koeficijent varijacije za određivanje kancelozne koštane gustoće, visine kralješaka i poprečno presječenih površina je oko 1,5% 1,3-0,8% (110). Nažalost kortikalna kost kralješaka nije dovoljno tanka da spriječi greške pri mjerenju.

U apendikularnom skeletu QCT se mjere 3 koštana parametra: površina poprečnog presjeka kosti (cm^2), kortikalna koštana površina (cm^2) i kortikalna koštana gustoća (111, 112). Specijalnim softverima se odvoji unutarnja i vanjska kortikalna površina. Koeficijent varijacije za sva tri mjerenja je između 0,6% i 1,5% (111,112). Mjerenje kancelozne kosti je nesigurnije zbog velikih anatomskih razlika u metafizama dugih kosti.

Druga često korištena metoda za procjenu mineralne gustoće kosti je ultrazvuk (QUS). Glavni razlozi njegove sve šire primjene su veliki porast interesa za osteoporozu zbog porasta prevalencije u svijetu, kao i zbog manjka dostupnosti DXA uređaja. Dodatna prednost ove metode je nepostojanje zračenja kojim se izlaže pacijent, pa je metoda prihvaćena za korištenje kod djece. Glavni nedostatak ove metode je nemogućnost mjerenja onih obilježja na temelju kojih se dijagnosticira osteoporozu, tako da se ultrazvuk mora smatrati zamjenskom metodom dijagnoze, tj. kao metoda probira.

Ultrazvučno se mjeri nekoliko pokazatelja. Prvi od njih je brzina prolaska zvuka kroz kost (engl. *Speed of sound*, SOS), zatim slabljenje ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (engl. *Broadband ultrasound attenuation*, BUA), a iz ova dva mjerenja programska podrška izračunava indeks kvantitativnog ultrazvuka (engl. *Quantitative ultrasound indeks*, QUI), parametar koji predstavlja kombinaciju BUA i SOS. QUS ima nekoliko značajnih prednosti u odnosu na DXA: ne koristi ionizirajuće zračenje, znatno je jeftiniji, a sam aparat je lako prenosiv. Stoga je primjena ultrazvučne metode vrlo pogodna u epidemiološkim istraživanjima. Uz to, čini se, da za razliku od DXA, ova metoda 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.

Mnoga su istraživanja pokazala da se na temelju vrijednosti ultrazvučnih parametara kosti može procijeniti rizik prijeloma kralježaka i bedrene kosti. Velika studija EPIDO, provedena na 7.598 žena, pokazala je da kod smanjenja vrijednosti BUA/SOS za 1 SD, relativni rizik prijeloma kuka iznosi 2,0 odnosno 1,7, što je komparabilno s relativnim rizikom kod smanjenja BMD vrata bedrene kosti za 1 SD, a koji iznosi 1,9 (113).

Mane korištenja ultrazvuka pri mjerenju mineralne koštane gustoće stoga su:

- razlike u mjerenju korištenjem različitih uređaja
- većina istraživanja o ulozi QUS u procjeni rizika prijeloma je provedena na odraslim ženama, a s obzirom na utjecaj geometrije kosti na ultrazvučne parametre mogu se očekivati neke razlike u pedijatrijskoj populaciji
- za dijagnozu osteoporoze na temelju QUS petne kosti ne možemo koristiti kriterije SZO za DXA. Frost i suradnici su u svojem istraživanju pokazali da je kod T vrijednosti ≤ -1.8 za BUA i SOS proporcija postmenopauzalnih žena koja ima osteoporozu jednaka kao i kada koristimo kriterije SZO za DXA lumbalne kralježnice i kuka (114)
- osim jasnih kliničkih smjernica za dijagnozu osteoporoze na temelju ultrazvučnih parametara petne kosti, potrebno je provesti i terapijska istraživanja kojima će se utvrditi adekvatnost praćenja učinka lijeka ultrazvučnim mjerenjem osobina kosti.

1.11. UTJECAJ ČIMBENIKA OKOLINE I HORMONA NA AKUMULACIJU KOSTI TIJEKOM RASTA

S obzirom na postojeće trendove prema kojima se sve više vremena provodi gledajući televizor i radeći na kompjutoru, udio fizičke aktivnosti u svakodnevici se sve više smanjuje što predstavlja ozbiljnu prijetnju postizanju optimalne PBM. Prepubertalne gimnastičarke imaju veću površinu poprečnog presjeka podlaktice, usprkos kraćoj staturi. Vrijednosti izmjerene BMD izražene SD skorom su značajno veće od nule, u odnosu na kontrolnu grupu, u području ruku, nogu i kralježnice na svim mjestima većeg statičkog opterećenja. Istraživanja pokazuju da djeca i

adolescenti koji su fizički aktivniji postižu veću koštanu masu nego njihovi neaktivni vršnjaci (74,115).

Povoljan učinak fizičke aktivnosti na PBM dokazan je u brojnim opservacijskim i retrospektivnim istraživanjima. Tako je nedavno otkriveno da je razina fizičke aktivnosti u predškolske djece povezana sa sadržajem minerala u kosti i s BMD (116). Intervencijske studije, o utjecaju tjelesne aktivnosti, u dječjoj dobi na koštanu masu, koje su trajale 6 – 12 mj, i jedna koja je trajala 36 mjeseca (117), potvrđuju značajne promjene BMD bedrene kosti, a neke i porast BMD lumbalne kralješnice kao i ukupni BMC u intervencijskoj grupi.

Istraživanja o utjecaju različitih oblika fizičke aktivnosti na kost pokazala su da ispitanici koji se bave sportskim aktivnostima kao što su ragbi, nogomet ili borbene vještine (*“weight bearing”*) imaju veći BMD nego oni koji su se bavili sportovima kao što su plivanje ili ronjenje (*“weight lifting”*) (116,118). Naime, perimenopauzalne i postmenopauzalne žene koje su tijekom adolescentne dobi aktivno vježbale imale su značajno veći BMD lumbalne kralješnice i bedrene kosti nego one koje tijekom mladosti nisu sudjelovale u redovitoj fizičkoj aktivnosti (119). Ostaje otvoreno pitanje odražava li se ovaj povoljan utjecaj fizičke aktivnosti na skelet u razvoju i u starijoj dobi budući da do sada nije bilo prospektivnih istraživanja u tom smislu. Ipak, rezultati nekih retrospektivnih analiza ukazuju da je taj pozitivni učinak dugotrajan, ali uz stalno prisutnu tjelesnu aktivnost.

1.11.1. Unos kalcija i vršna koštana masa

Prvi podaci koji ukazuju na utjecaj kalcija u prehrani na PBM dolaze iz istraživanja u kojem se uspoređivala koštana masa između dvije subpopulacije u Hrvatskoj s različitim unosom kalcija (120). Vidljive razlike u izmjerenoj koštanoj masi su bile prisutne kod tridesetogodišnjaka i vjerojatno su nastale kao posljedica pojačanog unosa kalcija tijekom puberteta. Brojne epidemiološke studije su dokazale povećanu prevalenciju osteoporoze u regijama gdje je unos kalcija hranom izrazito nizak (121). Pozitivan učinak unosa kalcija na stvaranje kosti kasnije je potvrđen i u mnogim kontroliranim istraživanjima u kojima su mlade zdrave osobe dobivale preparate kalcija kroz 1-3 godine. Rezultati tih istraživanja su pokazali da je u ovih osoba došlo do većeg porasta koštane mase u usporedbi s kontrolnom populacijom (122-124). Iako su dvije studije dokazale povećanje veličine kosti tijekom dodavanja

kalcija, ukupni učinak je različit po skeletnom mjestu, ranije unesenoj količini kalcija prije istraživanja i pubertalnim stadijem (124,125). Ukupni učinak kalcija na povećanje BMC i BMD u većini studija nije prelazio 5%. Učinak je bio izraženiji u razdoblju prije puberteta, i to u području kortikalne kosti, te u osoba čiji je dnevni unos kalcija prije ulaska u istraživanje bio manji od 850 mg (125). Ipak, još uvijek nije poznato ima li ovo povećanje BMD, koje je rezultat relativno kratkotrajnog uzimanja nadomjestaka kalcija, dugotrajniji učinak i hoće li se ogledati u smanjenom riziku od nastanka osteoporoze u kasnijoj dobi. Većina autora smatra da pozitivan učinak primjene nadomjesnih preparata kalcija nestaje kada se terapija prekine. Neke studije pokazuju da benefit traje do 12 mjeseci po prekidu uzimanja.

1.11.2. Hormoni i vršna koštana masa

Za normalan razvoj kosti neophodna je, među inim, i odgovarajuća interakcija hormona, 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 (126). Također, amenoroične djevojke imaju manji BMD lumbalne kralježnice u usporedbi s djevojkama koje imaju normalne menstruacijske cikluse (127). Manja PBM je nađena i u osoba s idiopatskim zakašnjelim pubertetom (128).

Čini se da je estrogen i u muškaraca i u žena glavni spolni steroid koji regulira rast i sazrijevanje kosti (129). Naime, u muškaraca je glavni spolni hormon testosteron čije je djelovanje na kost posredovano vezanjem na androgeni receptor, no najveći se dio učinka ostvaruje nakon konverzije u estrogen putem specifične aromataze nazočne u osteoblastima (130). To potvrđuju i opisi muškaraca s manjkom aktivnosti aromataze ili s oštećenom funkcijom receptora za estrogen u kojih je, usprkos normalnoj koncentraciji testosterona, bila nazočna osteoporoza i zakašnjelo zatvaranje epifiznih pukotina (131-133). Najveći dio učinka GH na kost odvija se preko IGF-I koji potiče aktivnost osteoblasta i sintezu kolagena jer koncentracija IGF-I korelira s površinom poprečnog presjeka bedrene kosti, a manjak hormona rasta u dječjoj dobi udružen je s niskim BMD, budući da ova djeca ne postižu očekivane vrijednosti PBM (134,135). Konačno, potrebno je spomenuti i ulogu vitamina D u koštanom metabolizmu, koji je jedan od važnijih čimbenika (84-86,88).

1.12. PUBERTET, RAST I RAZVOJ I DINAMIKA RAZVOJA KOSTI

Pubertet i pojave vezane uz njega su kombinacija niza anatomskih i fizioloških promjena koje uključuju ubrzanje tjelesnog rasta i razvoja. Prijelaz od djeteta do odrasle osobe, sposobne za normalnu reprodukciju, rezultat je niza hormonskih promjena koje se zbivaju manje - više u pravilnom redoslijedu. Promjene u fizičkom pogledu koje su rezultat ovih djelovanja hormona u pubertetu, napose razvoj sekundarnih spolnih oznaka, danas se klasificiraju prema opće prihvaćenim Tannerovim kriterijima i tablicama. Treba međutim imati na umu da su fiziološke varijacije koje se odnose na početak puberteta vrlo široke. Isto su tako velike varijacije u razdoblju koje prođe od pojave prvih sekundarnih spolnih oznaka do postizanja potpune spolne zrelosti (136).

Srednja dob početka puberteta u djevojčica je u nas oko 10 godina. Prva sekundarna spolna oznaka koja se uočava je povećanje prsa, ali ponekad to može biti i pojava pubične dlakavosti, ili se pak one javljaju istodobno. U dječaka pubertet počinje kasnije, pa je srednja dob početka puberteta dječaka u nas oko 12 godina. Prva sekundarna spolna oznaka koja se vidi u dječaka je povećanje testisa. S izuzetkom gonada, koje rastu pod utjecajem gonadotropina, praktički sve ostale vidljive promjene udružene s pojavom puberteta rezultat su povećane produkcije steroidnih hormona. Ovi hormoni izlučuju se izravno iz gonada i nadbubrežnih žlijezda ili manjim dijelom nastaju pretvorbom steroidnih preteča iz kore nadbubrežnih žlijezda. Kao rezultat njihova djelovanja u djevojčica dolazi do razvoja prsa, ženskog tipa raspodjele masnog tkiva, razvoja vagine i uterusa, ubrzanja rasta i dozrijevanja kostiju, a u dječaka do razvoja pubične, aksilarne dlakavosti i dlakavosti lica, rasta penisa, povećanja mišićne mase te rasta i dozrijevanja kostiju (136).

Usporedo s pojavom sekundarnih spolnih oznaka, jako ubrzanim rastom u visinu i koštanim dozrijevanjem, u pubertetu u oba spola ubrzano raste i tjelesna težina, te dolazi do porasta srca i trbušnih organa. Uz to je za djevojčice tipično da im rastu pubične kosti, donji dio crijevnice kosti, a u dječaka se povećava širina ramena i dužina stopala. Pored očitih razlika s obzirom na razvoj sekundarnih spolnih oznaka, međusobno se razlikuju krivulje rasta u dječaka i djevojčica u pubertetu. Tako djevojčice dosežu oko 85% svoje konačne visine u vrijeme kada im je koštana dob oko 10 godina, a dalja 23-38 cm dobiju tijekom puberteta. Oko 95% konačne visine

dostignu kada im je koštana dob oko 13 godina. Maksimalna brzina rasta u djevojčica je u dobi od oko 12 godina, odnosno oko godinu i pol dana prije menarhe. Nakon menarhe djevojčice obično narastu još samo 5-7cm. Dječaci oko 84% svoje konačne visine dostignu kada im je koštana dob oko 12 godina, a oko 85% konačne visine s koštanom dobi od oko 15 godina. Maksimalna brzina rasta u dječaka je u dobi od oko 14 godina, a tijekom 4-5 godina pubertetskog razvoja izrastu oko 28 cm (137).

2. CILJEVI I HIPOTEZA

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je osteoporoza bolest koja je po svojim obilježjima složena i da pojavi osteoporoze doprinose i genski i okolišni čimbenici. Genska komponenta nastanka osteoporoze iznosi od 50 do 85%. Mnoge studije na blizancima, te u pojedinim obiteljima nedvojbeno ukazuju da genetski faktori imaju važnu ulogu u regulaciji mineralne koštane gustoće, skeletne geometrije, brzine koštane pregradnje i da tako značajno doprinose patogenezi osteoporoze, a kasnije i osteoporotičnog prijeloma. Osim na BMD, genetski čimbenici utječu i na fenotipske značajke vezane uz osteoporozu, kao što su biokemijski biljezi koštane pregradnje, geometrija kosti, ultrazvučni parametri kosti, indeks tjelesne mase, mišićna snaga, te dob prve i zadnje menstruacije (79-84).

Rezltati dosadašnjih istraživanja ukazali su na povezanost polimorfizma alela gena za čimbenik rasta sličan inzulinu, gena za alfa receptor za estrogen, gena za receptor za androgen, gena za aromatazu, gena za receptor vitamina D i gena za alfa 1 tip 1 kolagena s koštanom mineralnom gustoćom, geometrijom kosti, osteoporozom i osteoporotičnim prijelomom. Sva istraživanja su rađena na odrasloj populaciji. U posljednjih nekoliko godina počelo se istraživati povezanost pojedinih gena s parametrima koštane gustoće u djece.

Na temelju do sada poznatih činjenica o utjecaju genskih polimorfizama na koštanu gustoću, osnovna hipoteza doktorske disertacije je da su vrijednosti ultrazvučnih parametara petne kosti u dječjoj dobi ovisne su o nazočnosti specifičnih alela mikrosatelitnih regija gena za alfa estrogeni receptor, gena za androgeni receptor, gena za IGF-1 i gena za aromatazu. Utjecaj gena na metabolizam kosti može biti modificiran prehranom, tjelesnom aktivnošću, pušenjem i ostalim čimbenicima okoline.

U skladu s navedenom hipotezom, **ciljevi** disertacije su:

1. odrediti vrijednosti ultrazvučnih parametara petne kosti u djece na početku puberteta;
2. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece na početku puberteta i specifičnih genetskih polimorfizama mikrosatelitnih regija

gena za alfa estrogene receptore, gena za androgene receptore, gena za IGF-1 i gena za aromatazu.

Sekundarni ciljevi:

1. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece prije puberteta i hormonskog statusa;
2. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece prije puberteta i koncentracije 25-OHD3;
3. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece prije puberteta i biljega koštane pregradnje;
4. analizirati međuovisnost genetskih polimorfizama mikrosatelitnih regija gena za alfa estrogene receptore, gena za androgene receptore, gena za IGF-1 i gena za aromatazu u djece na početku puberteta i biljega koštane pregradnje, hormonskog statusa i koncentracije 25-OHD3;
5. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece prije puberteta i tjelesne aktivnosti;
6. analizirati međuovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u djece prije puberteta i prehrambenih navika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. OPIS UZORKA

Ovo istraživanje provedeno je na uzorku 168 djece, od čega 85 (50,6%) djevojčica i 83 dječaka (49,4%). Dob ispitanika bile je ograničena na 11 do 13 godina. Uzorak djece sastojao se od ispitanika iz osnovne škole u Slavonskom Brodu (dvije u centru i dvije na periferiji), uključivanjem učenika 5. i 6. razreda. Škole su izabrane zbog mogućnosti lagane provedbe istraživanja, logističke potpore s ciljem da se obuhvate dvije gradske i dvije škole sa seoskog područja. U svakoj školi je održano uvodno predavanje o zdravoj prehrani. Ovakva predavanja i uključivanje ispitanika u istraživanje provedena su od 1. do 15. 06. 2007. godine. Uz djecu, pozvani su i roditelji da ispune anketni upitnik o prehranbenim navikama njihove djece te o vrsti i količini tjelesne aktivnosti. U prvom koraku uključivanja ukupno je 300 roditelja ispunilo anketne upitnike.

Roditelji su morali potvrditi suglasnost za uključivanje djece u studiju potpisivanjem informiranog pristanka (Prilog 1, 2, 3). Ukupno je 175 roditelja pristalo uključiti djecu u istraživanje. Ispitanicima je uzet uzorak od 30 ml krvi za genetska i biokemijska istraživanja, od čega 7 uzoraka nije bilo zadovoljavajuće kvalitete, pa se stoga konačni uzorak sastojao od 168 djece.

3.2. MJERENJE ULTRAZVUČNIH PARAMETARA KOŠTANE GUSTOĆE

Svakom je ispitaniku učinjena uzv denzitometrija kosti. Korišten je uređaj Sahara (Hologic, Beresford SAD). Uređaj se sastoji od dva prijenosnika zvuka i programa za analizu podataka. Svim ispitanicima je učinjeno mjerenje gustoće petne kosti ne-dominantne noge (tj. lijeve petne kosti dešnjacima i suprotno). Mjerenja su uključivala SOS i BUA, dok je QUI koji predstavlja kombinaciju prethodna dva parametra izračunat pomoću programske podrške aparata. Aparat je svakodnevno kalibriran upotrebom modela. Mjerenje su provodile dvije medicinske sestre.

Svakom ispitaniku je izmjerena visina i težina te procjena stadija rasta po Tanneru. Dodatno je svakom ispitaniku uzet uzorak periferne venske krvi za biokemijsku, hormonalnu i genetsku analizu. Ova mjerenja provodile su dvije liječnice

školske medicine. Roditelji su ispunili anketni upitnik o dosadašnjim bolestima, prethodnim prijelomima, životnim navikama i nazočnosti osteoporoze u obitelji.

3.3. LABORATORIJSKA MJERENJA

3.3.1. Biljezi koštane pregradnje

Svim ispitanicima su određene serumske koncentracije koštanog izoenzima alkalne fosfataze (K-AP) i osteokalcina kao biljega koštane izgradnje, te β -crosslapsa kao biljega koštane razgradnje. Sva tri biljega su određena metodom ELISA tvrtke Nordic Bioscience Diagnostics.

3.3.2. Analiza hormona

Svim ispitanicima određene su serumske koncentracije estradiola (E_2), slobodnog testosterona i 25-OHD3. E_2 je određen metodom s ligandima tvrtke Ortho Johnson & Johnson, slobodni testosteron je određen radioimunokemijskom metodom tvrtke DPC, a 25-OHD3 je određen metodom ELISA tvrtke IDS.

3.3.3. Određivanje alela mikrosatelitnih lokusa

Svim ispitanicima uzeto je 5ml periferne krvi s EDTA i iz uzorka je izolirana DNA pomoću komercijalnog kita za izolaciju DNA (Nucleospin Blood kit, Macherey-Nagel, Duren, Njemačka). Uspješnost izolacije provjerena je na 2% agaroznom gelu. Osnovne značajke umnažanja, primeri-početnice i uvjeti lančane reakcije polimerazom (PCR) za četiri mikrosatelitna lokusa (Tablica 3.1). Za svaki pojedini uzorak DNA priređene su 4 odvojene PCR reakcije, ukupan volumen svake pojedine reakcije bio je 25 μ l, a PCR reakcija sadržavala je slijedeće kemikalije: H₂O (20.0 μ l), PCR pufer (2.5 μ l), dNTPs (0.25 μ l), 5' primer obilježen bojom Cy-5 (0.5 μ l), 3' primer (0.5 μ l), Taq polimeraza (0.25 μ l), DNA (1.0 μ l).

Tablica 3.1. Osnovna obilježja, primeri-početnice i uvjeti umnažanja za četiri analizirana mikrosatelitska lokusa, na temelju podataka proizvođača (Nucleospin Blood kit, Macherey-Nagel, Duren, Njemačka)

| LOKUS | KROMOSOM | SEKVENCA | BROJ ALELA | 5' PRIMER | 3' PRIMER | PCR UVJETI |
|--------------|----------|----------|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| CYP19 | 15 | TTTA | 8 | GCA GGT ACT TAG TAG TTA GCT AC | TTA CAG TGA GCC AAG GTC GT | 95 ⁰ C 30" 60 ⁰ C 30" 35X 72 ⁰ C 30" 94 ⁰ C 50" |
| AR | X | CAG | 18 | TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC | GCT GTG AAG GTG GCT GTT CCT CAT | 58 ⁰ C 40" } 35X 72 ⁰ C 1' 94 ⁰ C 45" 70 ⁰ C 30" } 1X 72 ⁰ C 30" 94 ⁰ C 45" 70 ⁰ C (-1 ⁰ C/ciklus) 30" } 9X |
| IGF-I | 12 | CA | 6 | GCT AGC CAG CTG GTG TTA TT | ACC ACT CTG GGA GAA GGG TA | 94 ⁰ C 35" 61 ⁰ C 30" } 25X 72 ⁰ C 30" |
| ER | 6 | TA | 10 | GAC GCA TGA TAT ACT TCA CC | GCA GAA TCA AAT ATC CAG ATG | 94 ⁰ C 2' 58 ⁰ C 1' } 30X 74 ⁰ C 1' |

ER- α-receptor za estrogen, AR – receptor za androgen,IGF-I –rec. za čimbenik rasta sličan inzulinu,CYP19-receptor za aromatazu

Nakon PCR amplifikacije u aparatu za umnažanje (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, SAD) uzorci su dalje analizirani za dužinu

fragmenata u aparatu za automatsko određivanje dužine pojedine sekvence. Umnoženi uzorci DNA su priređivani za elektroforezu na 6% poliakrilamidnom gelu na ovaj način: 1 μ l DNA pomiješali smo s 3 μ l pufera za elektroforezu u kojem je boja, te s 1 μ l standarda. Uzorke DNA smo nakon toga denaturirali zagrijavanjem na 94°C u trajanju od 3 minute. Nakon što su uzorci priređeni za elektroforezu, sama elektroforeza je izvedena u automatskom laser sekvenceru DNA (ALFexpress, Pharmacia-Amersham, Uppsala, Švedska; Slika 3.1). Uvjeti elektroforeze su bili: 1200V, 50mA, 40W i 45°C kroz 300 minuta. Dužina fragmenata, odnosno alela, je određena pomoću laserom pobuđene fluorescencije i programa AlleleLocator-a (ALFexpress, Pharmacia-Amersham, Uppsala, Švedska).



Slika 3.1. ALFexpress, Pharmacia-Amersham sekvencer DNA
(<http://research.amnh.org>)

3.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Podaci su analizirani deskriptivnom statistikom i prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Za ispitivanje normalnosti distribucije podataka korišten je Kolmogorov-Smirnov test. Varijable koje nisu zadovoljile uvjet korištenja

parametrijskih metoda su prvo bile transformirane, korištenjem inverzne transformacije, kvadriranja ili korištenja korijena, da bi se postigla normalna raspodjela podataka. Korištene su slijedeće transformacije: logaritamska (QUI, BUA, indeks tjelesne mase i estrogen), inverzna (težina, testosteron i vitamin D), korjenska (crosslaps).

Za statističku analizu međuovisnosti genetskih polimorfizama, BMD, koncentracije biljega koštane pregradnje i koncentracije hormona korišteni su t-test za brojčane podatke s normalnom distribucijom i Mann-Whitney test za podatke koji ne pokazuju normalnu distribuciju. Korišteno je i stablo klasifikacije za predviđanje čimbenika koji su povezani s dijagnozom osteoporoze, koje se temeljilo na CHAID algoritmu koji je sastavni dio korištenog statističkog programskog paketa, uz korištenje 10 samoprovjera (engl. *crossvalidation*). Osim ovoga izrađen je i model hijerarhijske klasifikacije kojim su mjerene sličnosti između istraživanih varijabli. Model se temeljio na kvadriranoj euklidskoj udaljenosti između varijabli kao glavnom pokazatelju za klasifikaciju.

Alelne i genotipske frekvencije prikazane su apsolutnim i relativnim brojevima. Kako je zabilježen vrlo veliki broj genotipskih varijanti, za njih je izračunata genetska raznolikost, na temelju formule (138):

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Zbog vrlo visokih vrijednosti genotipske raznolikosti u analizi su korištene samo alelne varijante. U analizi povezanosti genetskih biljega s pokazateljima kvantitativnog ultrazvuka korišten je statistički test za trend, uz računanje rezultata analize varijance. Korištena su dva modela, linearni i nelinearni (kvadratni), koji su predstavljali dvije sastavnice genetičke varijance, linearnu i aditivnu. Zadnji korak analize bio je usmjeren na prepoznavanje svih važnih čimbenika koji su povezani s mineralnom koštanom gustoćom. Stoga je korištena multipla linearna regresija koja je prikazivala utjecaj svih prediktorskih varijabli na pokazatelje kvantitativnog ultrazvuka. U analizi je korišten statistički paket SPSS verzija 13, s razinom statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

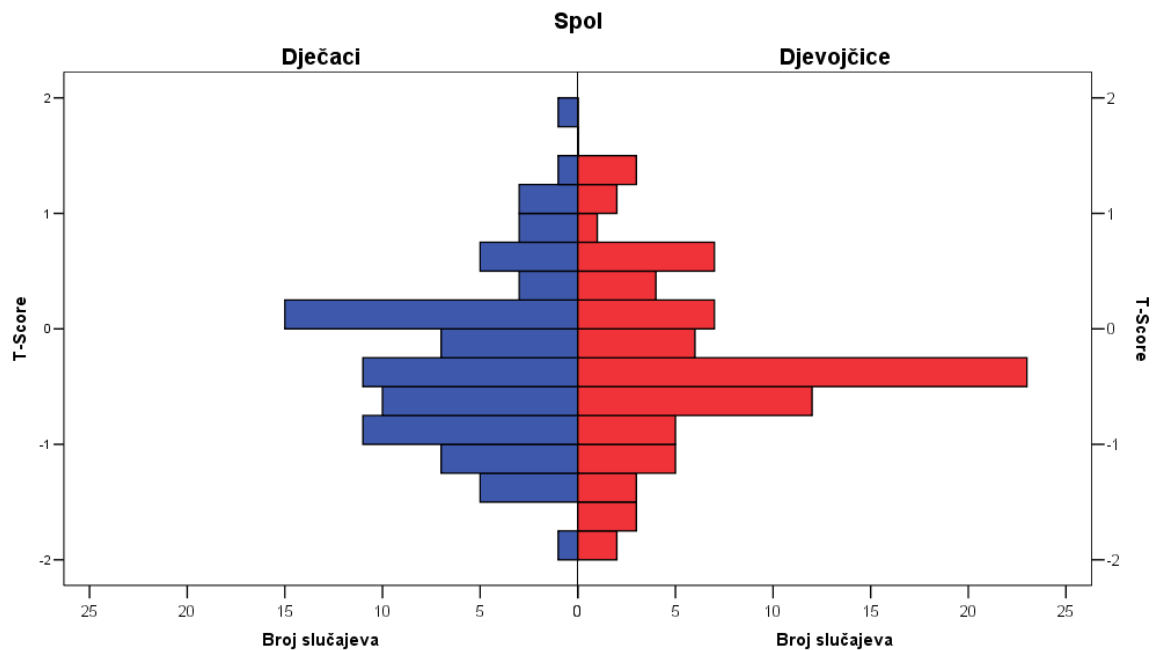
Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 168 djece, od čega 85 (50,6%) djevojčica i 83 dječaka (49,4%). Dječaci i djevojčice nisu se razlikovali po dobi (prosječna dob dječaka iznosila je $12,31 \pm 0,50$ godina, a djevojčica $12,34 \pm 0,51$ godina; $P=0,436$). Usporedba ostalih pojedinih obilježja između dječaka i djevojčica prikazana su u tablici 4.1. Djevojčice su bile značajno više, imale su nižu koncentraciju testosterona, nižu vrijednost vitamina D, kao i više vrijednosti estrogena i IGF-1. Nisu zabilježene statistički značajne razlike u ultrazvučnim mjerama koštane gustoće.

Tablica 4.1. Usporedba istraživanih pokazatelja između djevojčica i dječaka

| Svojstvo | Dječaci | | Djevojčice | | P* |
|---|--------------------|------------|---------------|------------|--------|
| | Srednja vrijednost | St. dev.** | Sred. Vrijed. | St. dev.** | |
| T-vrijednost | -0,30 | 0,73 | -0,35 | 0,73 | 0,660 |
| QUI | 97,6 | 11,9 | 97,4 | 12,2 | 0,902 |
| eBMD | 0,54 | 0,07 | 0,54 | 0,08 | 0,828 |
| BUA | 69,7 | 12,3 | 68,3 | 12,4 | 0,409 |
| SOS | 1560,7 | 19,8 | 1559,4 | 20,8 | 0,698 |
| Visina (cm) | 148,3 | 6,10 | 151,1 | 7,10 | 0,006 |
| Težina (kg) | 41,7 | 8,00 | 42,8 | 6,60 | 0,147 |
| Indeks tjelesne mase [ITM] (kg/m^2) | 18,9 | 2,70 | 18,7 | 2,40 | 0,801 |
| Testosteron (nmol/L) | 3,02 | 3,00 | 1,81 | 0,94 | 0,029 |
| Vitamin D ($\mu\text{mol}/\text{L}$) | 26,4 | 9,50 | 23,5 | 4,70 | 0,008 |
| Osteokalcin (nmol/L) | 143,2 | 50,3 | 154,1 | 52,9 | 0,172 |
| Crosslaps (nmol/L) | 1309,8 | 460,4 | 1206,2 | 383,3 | 0,147 |
| Protein veznik spolnih globulina (SHBG) | 71,6 | 35,2 | 77 | 31,7 | 0,145 |
| Albumin (g/L) | 44,5 | 2,60 | 44,2 | 2,30 | 0,324 |
| Estrogen (E2) (nmol/L) | 37,7 | 31,1 | 172,2 | 65,3 | 0,001 |
| IGF1 (nmol/L) | 65,0 | 28,9 | 85,9 | 20,1 | <0,001 |

*Korišten je t-test, samo za varijable koje su imale normalnu distribuciju, a za one koje nisu primijenjena je odgovarajuća transformacija kako bi se zadovoljio glavni uvjet korištenja t-testa; **St. dev – standardna devijacija

Temeljna usporedba pokazatelja koštane gustoće po spolu ukazala je na nešto veće vrijednosti kod dječaka nego djevojčica (Slika 4.1).



Slika 4.1. Prikaz T-vrijednosti uzv petne kosti među dječacima i djevojčicama

Usporedba alelnih frekvencija prikazana je u tablici 4.2. U genu CYP19 zabilježen je samo jedan varijantni alel, u genu IGF dva, a u genu ER tri varijantna alela (Tablica 4.2). Prikaz genotipskih frekvencija ukazao je na veliku razinu varijabilnosti. Tako je genotipska raznolikost (H) gena CYP19 iznosila 0,84, gena IGF-1 0,76, dok je raznolikost za gene AR i ER bila mnogo veća - 0,96 za oba gena (tablica 4.3).

Tablica 4.2. Alelne frekvencije istraživanih gena među dječacima i djevojčicama

| Gen | Alel (engl. <i>peaks</i>) | Dječaci | | Djevojčice | | Ukupno | |
|-----------|----------------------------|---------|------|------------|------|--------|------|
| | | N | % | N | % | N | % |
| CYP19 | 7 | 34 | 20,5 | 28 | 16,5 | 62 | 18,5 |
| | 7del3 | 56 | 33,7 | 60 | 35,3 | 116 | 34,5 |
| | 8 | 18 | 10,8 | 28 | 16,5 | 46 | 13,7 |
| | 9 | 3 | 1,8 | 2 | 1,2 | 5 | 1,5 |
| | 10 | 4 | 2,4 | 4 | 2,4 | 8 | 2,4 |
| | 11 | 35 | 21,1 | 37 | 21,8 | 72 | 21,4 |
| | 12 | 8 | 4,8 | 8 | 4,7 | 16 | 4,8 |
| | 13 | 1 | 0,6 | 0 | 0,0 | 1 | 0,3 |
| | 19.0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,6 | 1 | 0,3 |
| | Nepoznato | 7 | 4,2 | 2 | 1,2 | 9 | 2,7 |
| | 16 | 0 | 0,0 | 7 | 4,1 | 7 | 2,1 |
| | 17 | 9 | 5,4 | 12 | 7,1 | 21 | 6,3 |
| | IGF | 18 | 115 | 69,3 | 103 | 60,6 | 218 |
| 19 | | 20 | 12,0 | 27 | 15,9 | 47 | 14,0 |
| 20 | | 8 | 4,8 | 11 | 6,5 | 19 | 5,7 |
| 21 | | 2 | 1,2 | 2 | 1,2 | 4 | 1,2 |
| 16.8 | | 0 | 0,0 | 1 | 0,6 | 1 | 0,3 |
| 17.0 | | 0 | 0,0 | 1 | 0,6 | 1 | 0,3 |
| Nepoznato | | 12 | 7,2 | 6 | 3,5 | 18 | 5,4 |
| 15 | | 1 | 0,6 | 3 | 1,8 | 4 | 1,2 |
| 16 | | 3 | 1,8 | 6 | 3,5 | 9 | 2,7 |
| 17 | | 12 | 7,2 | 14 | 8,2 | 26 | 7,7 |
| AR | 18 | 11 | 6,6 | 21 | 12,4 | 32 | 9,5 |
| | 20 | 16 | 9,6 | 24 | 14,1 | 40 | 11,9 |
| | 21 | 9 | 5,4 | 19 | 11,2 | 28 | 8,3 |
| | 22 | 5 | 3,0 | 27 | 15,9 | 32 | 9,5 |
| | 23 | 11 | 6,6 | 23 | 13,5 | 34 | 10,1 |
| | 24 | 7 | 4,2 | 12 | 7,1 | 19 | 5,7 |
| | 25 | 2 | 1,2 | 7 | 4,1 | 9 | 2,7 |
| | 26 | 2 | 1,2 | 5 | 2,9 | 7 | 2,1 |
| | 27 | 1 | 0,6 | 2 | 1,2 | 3 | 0,9 |
| | 28 | 0 | 0,0 | 1 | 0,6 | 1 | 0,3 |
| Nepoznato | 86 | 51,8 | 6 | 3,5 | 92 | 27,4 | |

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

| Gen | Alel | Dječaci | | Djevojčice | | Ukupno | |
|-----|-----------|---------|------|------------|------|--------|------|
| | | N | % | N | % | N | % |
| ER | 11 | 1 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 1 | 0,3 |
| | 12 | 2 | 1,2 | 2,0 | 1,2 | 4 | 1,2 |
| | 13 | 8 | 4,8 | 18,0 | 10,6 | 26 | 7,7 |
| | 14 | 36 | 21,7 | 39,0 | 22,9 | 75 | 22,3 |
| | 15 | 11 | 6,6 | 17,0 | 10,0 | 28 | 8,3 |
| | 16 | 3 | 1,8 | 3,0 | 1,8 | 6 | 1,8 |
| | 17 | 2 | 1,2 | 2,0 | 1,2 | 4 | 1,2 |
| | 19 | 9 | 5,4 | 12,0 | 7,1 | 21 | 6,3 |
| | 20 | 3 | 1,8 | 7,0 | 4,1 | 10 | 3,0 |
| | 21 | 13 | 7,8 | 11,0 | 6,5 | 24 | 7,1 |
| | 22 | 13 | 7,8 | 9,0 | 5,3 | 22 | 6,5 |
| | 23 | 24 | 14,5 | 21,0 | 12,4 | 45 | 13,4 |
| | 24 | 12 | 7,2 | 5,0 | 2,9 | 17 | 5,1 |
| | 25 | 7 | 4,2 | 6,0 | 3,5 | 13 | 3,9 |
| | 26 | 3 | 1,8 | 2,0 | 1,2 | 5 | 1,5 |
| | 27 | 0 | 0,0 | 1,0 | 0,6 | 1 | 0,3 |
| | 15.6 | 5 | 3,0 | 9,0 | 5,3 | 14 | 4,2 |
| | 15.8 | 2 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 2 | 0,6 |
| | 16.0 | 0 | 0,0 | 2,0 | 1,2 | 2 | 0,6 |
| | Nepoznato | | 12 | 7,2 | 4,0 | 2,4 | 16 |

Tablica 4.3. Prikaz genotipskih frekvencija istraživanih gena

| CYP19 | | | |
|--------------|-------------|------------|----------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 1 | 7-7 | 7 | 4,4 |
| 2 | 7-8 | 3 | 1,9 |
| 3 | 7-10 | 2 | 1,3 |
| 4 | 7-11 | 11 | 6,9 |
| 5 | 7-12 | 1 | 0,6 |
| 6 | 8-8 | 8 | 5,0 |
| 7 | 8-9 | 4 | 2,5 |
| 8 | 8-10 | 1 | 0,6 |
| 9 | 8-11 | 10 | 6,3 |
| 10 | 8-12 | 2 | 1,3 |
| 11 | 9-11 | 1 | 0,6 |
| 12 | 10-11 | 3 | 1,9 |
| 13 | 11-11 | 11 | 6,9 |
| 14 | 11-12 | 2 | 1,3 |
| 15 | 11-13 | 1 | 0,6 |
| 17 | 7del3-7 | 31 | 19,5 |
| 18 | 7del3-8 | 10 | 6,3 |
| 19 | 7del3-10 | 2 | 1,3 |
| 20 | 7del3-11 | 22 | 13,8 |
| 21 | 7del3-12 | 2 | 1,3 |
| 22 | 7del3-19.2 | 1 | 0,6 |
| 23 | 7del3-7del3 | 24 | 15,1 |
| | Nepoznato | 9 | 5,4 |
| | Ukupno | 166 | 100,0 |

| IGF-1 | | | |
|--------------|-----------|------------|----------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 1 | 16-16 | 1 | 0,6 |
| 2 | 16-17 | 1 | 0,6 |
| 3 | 16-18 | 5 | 3,0 |
| 4 | 17.0-18 | 1 | 0,6 |
| 5 | 17-17 | 1 | 0,6 |
| 6 | 17-18 | 13 | 7,8 |
| 7 | 17-19 | 5 | 3,0 |
| 8 | 18-18 | 77 | 46,4 |
| 9 | 18-19 | 33 | 19,9 |
| 10 | 18-20 | 7 | 4,2 |
| 11 | 18-21 | 4 | 2,4 |
| 12 | 19-19 | 1 | 0,6 |
| 13 | 19-20 | 5 | 3,0 |
| 14 | 20-20 | 3 | 1,8 |
| | Nepoznato | 9 | 5,4 |
| | Ukupno | 166 | 100,0 |

| AR | | | |
|-----------|---------|------------|----------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 1 | 15-0 | 1 | 0,6 |
| 2 | 15-20 | 1 | 0,6 |
| 3 | 15-24 | 1 | 0,6 |
| 4 | 16-0 | 3 | 1,8 |
| 5 | 16-17 | 1 | 0,6 |
| 6 | 16-18 | 2 | 1,2 |
| 7 | 16-20 | 2 | 1,2 |
| 8 | 16-27 | 1 | 0,6 |
| 9 | 17-0 | 12 | 7,2 |
| 10 | 17-21 | 2 | 1,2 |
| 11 | 17-22 | 5 | 3,0 |
| 12 | 17-23 | 3 | 1,8 |
| 13 | 17-25 | 1 | 0,6 |
| 14 | 17-26 | 1 | 0,6 |
| 15 | 17-27 | 1 | 0,6 |
| 16 | 18-0 | 10 | 6,0 |
| 17 | 18-18 | 1 | 0,6 |
| 18 | 18-20 | 5 | 3,0 |
| 19 | 18-21 | 1 | 0,6 |
| 20 | 18-22 | 2 | 1,2 |
| 21 | 18-23 | 7 | 4,2 |
| 22 | 18-24 | 2 | 1,2 |
| 23 | 18-26 | 1 | 0,6 |
| 24 | 20-0 | 16 | 9,6 |
| 25 | 20-20 | 3 | 1,8 |
| 26 | 20-21 | 3 | 1,8 |
| 27 | 20-22 | 3 | 1,8 |
| 28 | 20-23 | 2 | 1,2 |
| 29 | 21-0 | 9 | 5,4 |
| 30 | 21-21 | 3 | 1,8 |
| 31 | 21-22 | 1 | 0,6 |
| 32 | 21-23 | 3 | 1,8 |
| 33 | 21-24 | 1 | 0,6 |
| 34 | 21-25 | 1 | 0,6 |
| 35 | 21-28 | 1 | 0,6 |
| 36 | 22-0 | 5 | 3,0 |
| 37 | 22-22 | 5 | 3,0 |
| 38 | 22-23 | 3 | 1,8 |
| 39 | 22-25 | 1 | 0,6 |
| 40 | 22-26 | 1 | 0,6 |
| 41 | 23-0 | 10 | 6,0 |
| 42 | 23-23 | 1 | 0,6 |
| 43 | 23-24 | 2 | 1,2 |
| 44 | 23-26 | 1 | 0,6 |
| 45 | 24-0 | 7 | 4,2 |

Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici

Tablica 4.3. – nastavak s prethodne

stranice

| AR-nastavak | | | |
|--------------------|---------------|------------|--------------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 46 | 24-24 | 1 | 0,6 |
| 47 | 24-25 | 3 | 1,8 |
| 48 | 24-26 | 1 | 0,6 |
| 49 | 25-0 | 3 | 1,8 |
| 50 | 25-15 | 1 | 0,6 |
| 51 | 26-0 | 2 | 1,2 |
| 52 | 27-0 | 1 | 0,6 |
| | Nepoznato | 6 | 3,6 |
| | Ukupno | 166 | 100,0 |

| ER-nastavak | | | |
|--------------------|---------------|------------|--------------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 33 | 15-22 | 1 | 0,6 |
| 34 | 15-23 | 8 | 4,8 |
| 35 | 15-25 | 4 | 2,4 |
| 36 | 15.8-15.8 | 1 | 0,6 |
| 37 | 16-23 | 1 | 0,6 |
| 38 | 17-23 | 1 | 0,6 |
| 39 | 19-21 | 2 | 1,2 |
| 40 | 19-22 | 4 | 2,4 |
| 41 | 19-23 | 1 | 0,6 |
| 42 | 19-24 | 3 | 1,8 |
| 43 | 19-25 | 2 | 1,2 |
| 44 | 20-21 | 1 | 0,6 |
| 45 | 20-22 | 1 | 0,6 |
| 46 | 20-23 | 1 | 0,6 |
| 47 | 20-25 | 1 | 0,6 |
| 48 | 21-22 | 3 | 1,8 |
| 49 | 21-23 | 4 | 2,4 |
| 50 | 21-26 | 1 | 0,6 |
| 51 | 22-23 | 1 | 0,6 |
| 52 | 22-24 | 1 | 0,6 |
| 53 | 22-25 | 1 | 0,6 |
| 54 | 23-23 | 4 | 2,4 |
| 55 | 23-24 | 2 | 1,2 |
| 56 | 23-26 | 1 | 0,6 |
| 57 | 24-24 | 1 | 0,6 |
| 58 | 24-25 | 3 | 1,8 |
| 59 | 24-26 | 2 | 1,2 |
| | Nepoznato | 8 | 4,8 |
| | Ukupno | 166 | 100,0 |

| ER | | | |
|-----------|---------|------------|----------|
| Oznaka | Genotip | Učestalost | Postotak |
| 1 | 11-14 | 1 | 0,6 |
| 2 | 12-19 | 1 | 0,6 |
| 3 | 12-21 | 1 | 0,6 |
| 4 | 12-23 | 1 | 0,6 |
| 5 | 12-24 | 1 | 0,6 |
| 6 | 13-13 | 2 | 1,2 |
| 7 | 13-14 | 6 | 3,6 |
| 8 | 13-15 | 2 | 1,2 |
| 9 | 13-17 | 1 | 0,6 |
| 10 | 13-20 | 3 | 1,8 |
| 11 | 13-21 | 2 | 1,2 |
| 12 | 13-22 | 6 | 3,6 |
| 13 | 13-23 | 1 | 0,6 |
| 14 | 13-25 | 1 | 0,6 |
| 15 | 14-14 | 7 | 4,2 |
| 16 | 14-15 | 9 | 5,4 |
| 17 | 14-16 | 3 | 1,8 |
| 18 | 14-17 | 3 | 1,8 |
| 19 | 14-19 | 6 | 3,6 |
| 20 | 14-20 | 3 | 1,8 |
| 21 | 14-21 | 6 | 3,6 |
| 22 | 14-22 | 4 | 2,4 |
| 23 | 14-23 | 13 | 7,8 |
| 24 | 14-24 | 3 | 1,8 |
| 25 | 14-25 | 1 | 0,6 |
| 26 | 14-26 | 1 | 0,6 |
| 27 | 14-27 | 1 | 0,6 |
| 28 | 15-15 | 4 | 2,4 |
| 29 | 15-15.6 | 1 | 0,6 |
| 30 | 15-16 | 3 | 1,8 |
| 31 | 15-19 | 2 | 1,2 |
| 32 | 15-21 | 3 | 1,8 |

Korištenje djelomične klasifikacije prema Tanneru ukazalo je na postojanje statistički značajnih razlika u nekim istraživanim pokazateljima (tablica 4.4). Posebice je bila izražena promjena razine testosterona kod dječaka, estrogena kod djevojčica i dječaka te IGF-1 kod dječaka (tablica 4.4).

Tablica 4.4. Prikaz standardiziranih regresijskih koeficijenata i statističke značajnosti trenda porasta istraživanih obilježja po stadiju razvoja prema Tanneru (analiza trenda korištenjem analize varijance; prikazani su standardizirani regresijski koeficijenti i P vrijednosti)

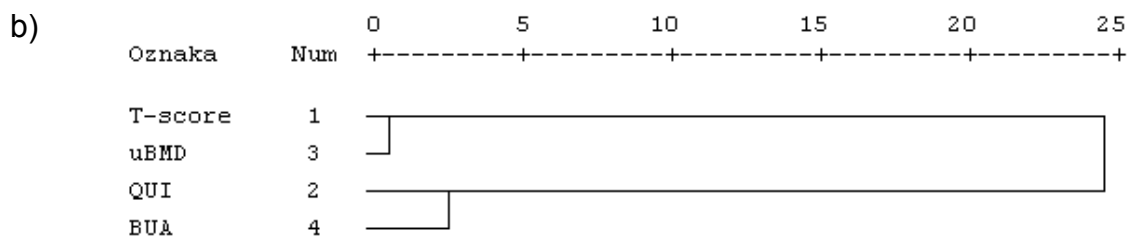
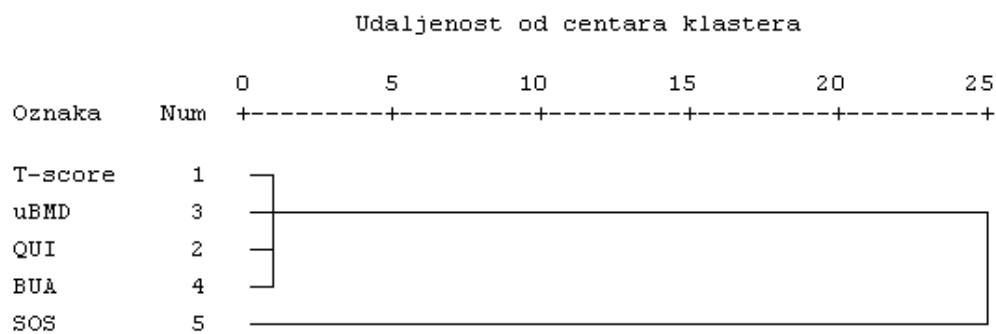
| | Dječaci | Djevojčice | Cijeli uzorak |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| T-vrijednost | -0,01 (0,904) | 0,02 (0,835) | 0,01 (0,998) |
| QUI | -0,02 (0,843) | 0,01 (0,920) | -0,01 (0,974) |
| eBMD | -0,02 (0,891) | 0,01 (0,952) | -0,01 (0,955) |
| BUA | -0,06 (0,585) | 0,10 (0,354) | 0,01 (0,860) |
| SOS | -0,03 (0,817) | -0,11 (0,329) | -0,07 (0,345) |
| Tjelesna visina | 0,13 (0,240) | 0,05 (0,680) | 0,13 (0,087) |
| Tjelesna težina | 0,22 (0,049) | 0,22 (0,045) | 0,23 (0,003) |
| Indeks tjelesne mase | 0,20 (0,067) | 0,22 (0,044) | 0,20 (0,011) |
| Testosteron | 0,59 (<0,001) | -0,01 (0,904) | 0,27 (<0,001) |
| 25OHD3 | -0,05 (0,632) | -0,08 (0,478) | -0,11 (0,177) |
| Osteokalcin | 0,33 (0,003) | 0,13 (0,229) | 0,24 (0,002) |
| Crosslaps | 0,41 (<0,001) | 0,41 (<0,001) | 0,35 (<0,001) |
| SHBG | -0,33 (0,003) | 0,12 (0,281) | -0,07 (0,349) |
| Albumin | -0,04 (0,699) | 0,17 (0,116) | 0,05 (0,565) |
| Estrogen | 0,32 (0,004) | 0,57 (<0,001) | 0,49 (<0,001) |
| IGF1 | 0,56 (<0,001) | 0,15 (0,182) | 0,44 (<0,001) |

Međuovisnost raznih pokazatelja ultrazvučnih mjerenja gustoće kosti ukazala je na veliki stupanj korelacije između istraživanih pokazatelja, koji je za sve usporedbe bio na razini $P < 0,001$, dok su se koeficijenti korelacije kretali od 0,58 (BUA-SOS) do gotovo potpune korelacije u BMD i QUI (tablica 4.5). Korištenje hijerarhijskog modela klasteriranja ukazalo je na najveće razlike SOS od ostalih mjera u prvom koraku analize, dok je nakon isključivanja SOS-a iz analize rezultat ukazivao na grupiranje T-vrijednosti i BMD u jednoj skupini i QUI i BUA u drugoj (slika 4.2).

Tablica 4.5. Koeficijenti korelacije između ultrazvučnih pokazatelja koštane gustoće

| | QUI/Stiffness | eBMD | BUA | SOS |
|----------------------|---------------|------|------|------|
| Cijeli uzorak | | | | |
| T-Score | 0,97 | 0,97 | 0,81 | 0,84 |
| QUI | | 0,99 | 0,84 | 0,86 |
| eBMD | | | 0,84 | 0,86 |
| BUA | | | | 0,58 |
| Dječaci | | | | |
| T-Score | 0,95 | 0,96 | 0,81 | 0,98 |
| QUI | | 0,99 | 0,86 | 0,94 |
| eBMD | | | 0,86 | 0,94 |
| BUA | | | | 0,65 |
| Djevojčice | | | | |
| T-Score | 0,99 | 0,99 | 0,82 | 0,79 |
| QUI | | 0,99 | 0,82 | 0,78 |
| eBMD | | | 0,82 | 0,79 |
| BUA | | | | 0,52 |

a) Dendrogram na temelju kvadrirane euklidske udaljenosti između varijabli



Slika 4.2. Rezultat hijerarhijskog klasteriranja (dendrogram) za analizu sličnosti između mjera kvantitativnog ultrazvuka; a) sve mjere, b) bez SOS

Analize međuovisnosti pokazatelja mineralne koštane gustoće s hormonalnim razinama ukazala je na postojanje statistički značajne korelacije između pojedinih varijabli, posebice SHBG i ultrazvučnih pokazatelja mineralne koštane gustoće (tablica 4.6).

Tablica 4.6. Prikaz korelacijskih koeficijenata između istraživanih varijabli korištenjem Pearsonovog testa; statistički značajni koeficijenti korelacije na razini $P < 0,05$ prikazani su masno otisnutim slovima

| | Testo- steron | Vitamin D | Osteo- kalcin | Crossla- ps | SHBG | Estrogen | IGF1 |
|---|------------------|--------------|------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| T-vrijednost | 0,07 | <0,01 | <0,01 | 0,05 | 0,17 | -0,05 | -0,03 |
| QUI | 0,06 | 0,03 | <0,01 | 0,03 | 0,18 | -0,02 | -0,01 |
| eBMD | 0,06 | 0,02 | -0,01 | 0,03 | 0,17 | -0,03 | -0,02 |
| BUA | -0,01 | 0,02 | -0,08 | 0,08 | 0,08 | -0,04 | 0,04 |
| SOS | 0,13 | <0,01 | 0,06 | 0,02 | 0,17 | -0,07 | -0,08 |
| Visina | -0,06 | 0,13 | -0,04 | -0,03 | -0,19 | 0,25 | 0,29 |
| Tjelesna težina | 0,24 | -0,12 | 0,03 | -0,06 | 0,30 | -0,16 | -0,25 |
| Indeks tjelesne mase | -0,26 | 0,06 | -0,03 | 0,08 | -0,26 | 0,02 | 0,12 |
| Testosteron | - | 0,07 | -0,09 | -0,21 | 0,34 | 0,03 | -0,38 |
| Vitamin D | 0,07 | - | 0,03 | -0,01 | 0,02 | 0,23 | 0,14 |
| Osteokalcin | -0,09 | 0,03 | - | 0,6 | 0,12 | 0,15 | 0,15 |
| Crosslaps | -0,21 | -0,01 | 0,6 | - | -0,02 | <0,01 | 0,09 |
| Protein veznik spolnih globulina (SHBG) | 0,34 | 0,02 | 0,12 | -0,02 | - | 0,02 | -0,24 |
| Estrogen | 0,03 | 0,23 | 0,15 | 0 | 0,02 | - | 0,53 |
| IGF1 | -0,38 | 0,14 | 0,15 | 0,09 | -0,24 | 0,53 | - |

Procijenjeni unos kalcija bio je statistički značajno i pozitivno povezan sa svim pokazateljima mineralne gustoće kosti; korelacijski koeficijenti mijenjali su se od 0,32 za SOS do 0,43 za T-vrijednost, a svi su bili statistički značajni na razini od $P < 0,001$. Suprotno tome, analiza pokazatelja koštane gustoće u vezi s količinom sna nije rezultirala niti jednom statistički značajnom korelacijom. Analiza ostalih čimbenika ukazala je na statistički značajnu povezanost pokazatelja mineralne koštane gustoće

s korištenjem gaziranih pića i razinom fizičke aktivnosti, granično značajno s gledanjem televizora, a nije bila značajna za vrijeme provedeno pred kompjuterom kao niti za procjenu izloženosti suncu tijekom ljetnog ili zimskog razdoblja (tablica 4.7).

Tablica 4.7. Prikaz razina statističke značajnosti u analizi pokazatelja koštane gustoće i odabranih čimbenika ponašanja i rizika za razvoj osteoporoze

| | Gazirana pića | Tjelesna aktivnost | Gledanje televizora | Korištenje kompjutera | Izloženost suncu ljeti | Izloženost suncu zimi |
|--------------|---------------|--------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| T-vrijednost | <0,001 | <0,001 | 0,023 | 0,260 | 0,221 | 0,320 |
| QUI | <0,001 | <0,001 | 0,038 | 0,216 | 0,117 | 0,350 |
| eBMD | <0,001 | <0,001 | 0,027 | 0,190 | 0,100 | 0,296 |
| BUA | 0,007 | 0,001 | 0,043 | 0,255 | 0,052 | 0,164 |
| SOS | <0,001 | <0,001 | 0,213 | 0,676 | 0,243 | 0,758 |

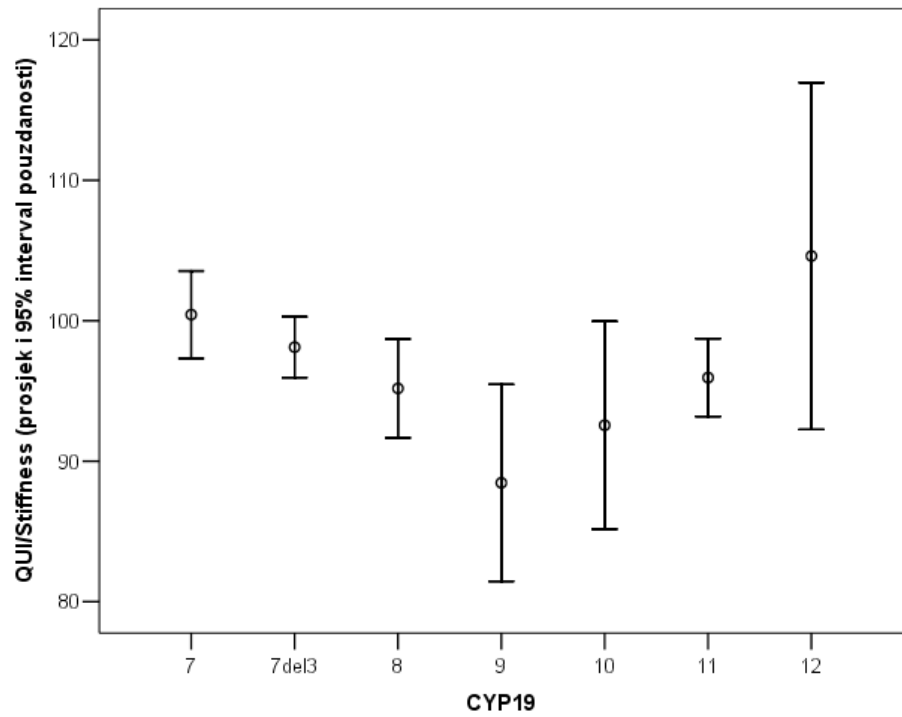
U analizi povezanosti genetskih biljega s pokazateljima mineralne koštane gustoće izrađen je linearni i nelinearni model učinka alelnih varijanti na istraživane pokazatelje. Korišten je linearni regresijski model i nelinearni (kvadratni) regresijski model, koji je predstavljao mogući aditivni učinak alelnih varijanti. Rezultati su ukazivali na statistički značajne rezultate za CYP-19 i AR, i to za oba gena samo u aditivnom modelu (Tablica 4.8). Uz to je zabilježen i linearni statistički značajan trend na vrijednostima SOS i gena za CYP-19 (Tablica 4.8). Prikaz ovisnosti nekih pokazatelja koštane gustoće i alelnih varijanti za gen CYP-19 prikazan je na slici 4.3 a) i 3 b).

Tablica 4.8. Prikaz linearnog i nelinearnog trenda povećanja broja ponavljanja unutar svakog alela i njegove povezanosti s ultrazvučnim pokazateljima koštane gustoće

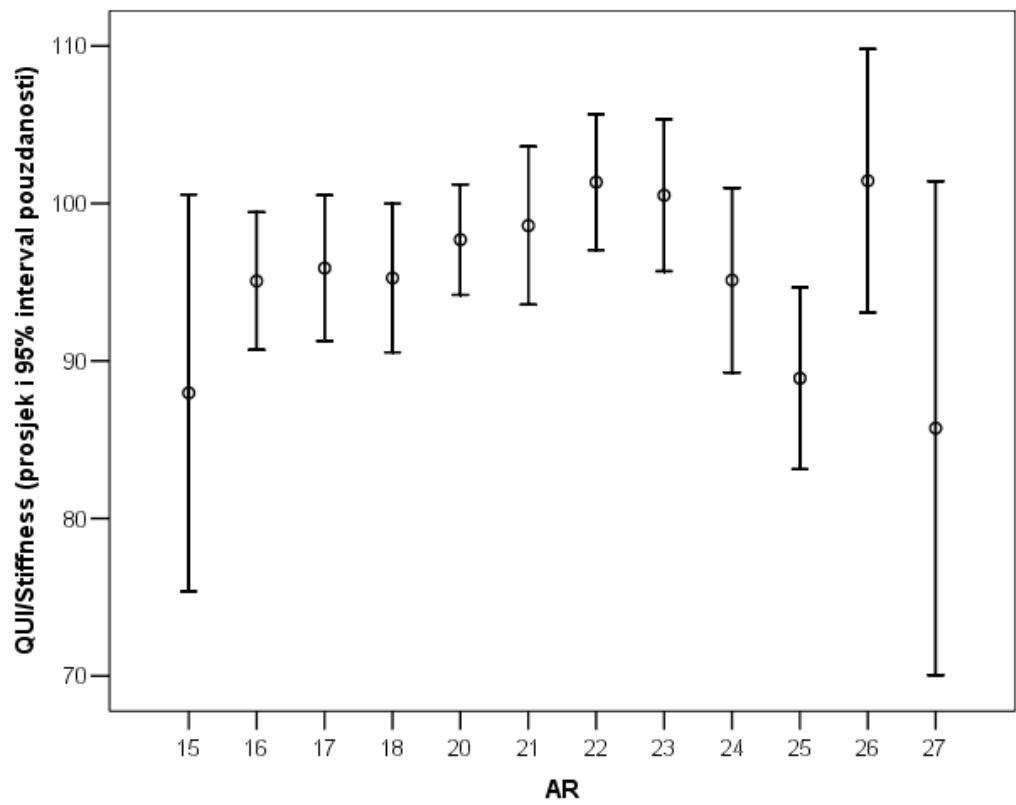
| Gen | Pokazatelj | Linearni model | | Nelinearni model | |
|--------|------------|----------------|-------|------------------|--------|
| | | β | P | β | P |
| CYP-19 | T-score | -0,07 | 0,226 | 3,32 | 0,001 |
| | QUI | -0,07 | 0,253 | 4,15 | <0,001 |
| | eBMD | -0,07 | 0,225 | 4,10 | <0,001 |
| | BUA | -0,01 | 0,867 | 3,62 | 0,001 |
| | SOS | -0,12 | 0,034 | 3,01 | 0,008 |
| IGF1 | T-score | 0,03 | 0,957 | 0,13 | 0,862 |
| | QUI | <0,01 | 0,938 | 0,16 | 0,833 |
| | eBMD | <0,01 | 0,934 | 0,15 | 0,851 |
| | BUA | 0,02 | 0,692 | -0,43 | 0,565 |
| | SOS | -0,01 | 0,927 | 0,72 | 0,349 |
| AR | T-score | 0,06 | 0,376 | -1,97 | 0,020 |
| | QUI | 0,07 | 0,271 | -2,23 | 0,026 |
| | eBMD | 0,07 | 0,268 | -1,93 | 0,022 |
| | BUA | 0,05 | 0,454 | -1,14 | 0,179 |
| | SOS | 0,02 | 0,754 | -1,79 | 0,034 |
| ER | T-score | -0,02 | 0,711 | 0,17 | 0,825 |
| | QUI | -0,03 | 0,556 | 0,27 | 0,723 |
| | eBMD | -0,04 | 0,541 | 0,33 | 0,669 |
| | BUA | 0,01 | 0,890 | 0,26 | 0,730 |
| | SOS | -0,02 | 0,703 | 0,52 | 0,496 |

β – standardizirani regresijski koeficijent

a)



b)



Slika 4.3. Prikaz pokazatelja koštane gustoće i njihove povezanosti s a) CYP19 i b) gen za AR

Prijašnja istraživanja su ukazala na nekoliko otprije poznatih alela koji su povezani s mineralnom koštanom gustoćom, koji su zatim uspoređeni s drugim skupinama. Najpoznatiji je učinak CYP19 7del3. U analizi su korišteni i ostali najčešći aleli drugih gena (tablica 4.9). Ispitanici koji su imali alel CYP19 7del3 imali su bolje vrijednosti uzv parametara petne kosti, QUI je bio 3,4% bolji, BUA 3,7% veća, a BMD 4,0% bolji nego u ostalih ispitanika.

Tablica 4.9. Prikaz razine statističke značajnosti za odabrane alele i pokazatelje ultrazvučne gustoće kosti

| Pokazatelj | CYP19; | | | |
|------------|---------------|----------------|----------------|-------------|
| | CYP19; alel 7 | alel 7 (-del3) | IGF-1: alel 18 | ER; alel 14 |
| T-Score | 0,131 | 0,988 | 0,259 | 0,493 |
| QUI | 0,042 | 0,551 | 0,237 | 0,582 |
| eBMD | 0,043 | 0,586 | 0,250 | 0,582 |
| SOS | 0,143 | 0,548 | 0,643 | 0,820 |
| BUA | 0,020 | 0,573 | 0,348 | 0,414 |

Povezanost alelnih varijanti s pokazateljima pregradnje kosti s vrijednostima spolnih hormona ukazala je na postojanje statistički značajne povezanosti CYP19 gena i crosslapsa u nelinearnom modelu, gena za aromatazu i crosslapsa u linearnom modelu, te koncentracije estrogena i testosterona. (tablica 4.10).

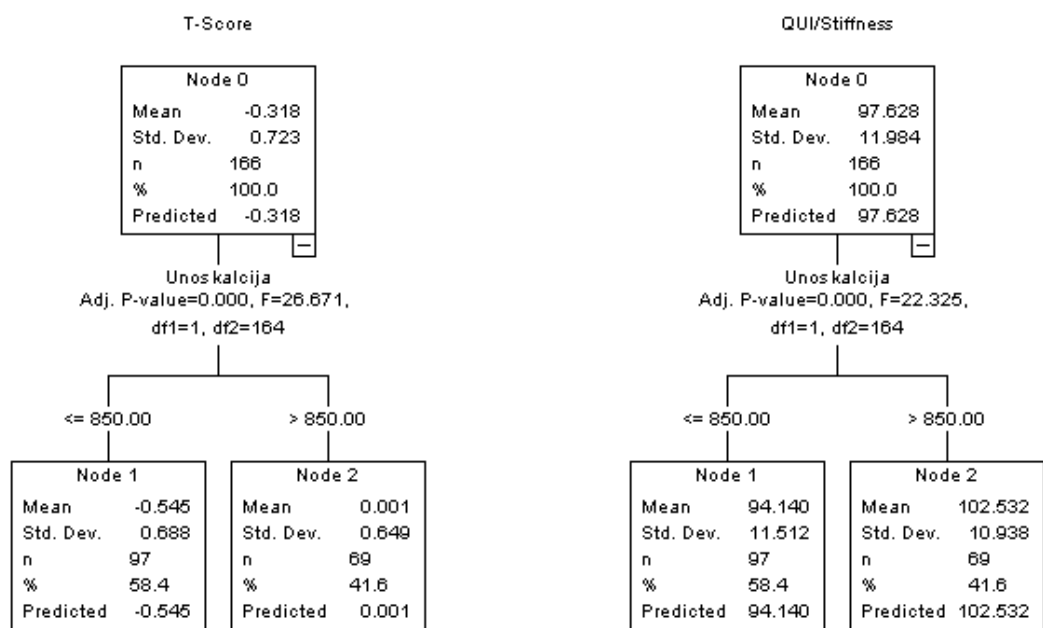
Tablica 4.10. Prikaz povezanosti genetskih biljega i odabranih pokazatelja pregradnje kosti i hormona

| Gen | Pokazatelj | Linearni model | | Nelinearni model | |
|-------|-------------|----------------|-------|------------------|-------|
| | | β | P | β | P |
| CYP19 | Testosteron | 0,01 | 0,889 | -2,16 | 0,059 |
| | Osteokalcin | -0,01 | 0,804 | -1,79 | 0,119 |
| | Crosslaps | -0,02 | 0,767 | -2,91 | 0,011 |
| | SHBP | -0,03 | 0,609 | 0,08 | 0,945 |
| | Albumin | -0,08 | 0,142 | 0,43 | 0,708 |
| | E2 | 0,07 | 0,222 | -0,56 | 0,626 |
| | IGF | 0,03 | 0,579 | -1,00 | 0,389 |
| | Vitamin D | -0,05 | 0,424 | -0,59 | 0,636 |
| IGF1 | Testosteron | 0,04 | 0,466 | -1,65 | 0,202 |
| | Osteokalcin | -0,01 | 0,959 | 0,17 | 0,896 |
| | Crosslaps | 0,05 | 0,380 | 0,54 | 0,676 |
| | SHBP | -0,06 | 0,307 | 0,164 | 0,899 |
| | Albumin | -0,01 | 0,924 | 0,54 | 0,677 |
| | E2 | -0,03 | 0,571 | 2,48 | 0,055 |
| | IGF | 0,03 | 0,585 | 1,87 | 0,148 |
| | Vitamin D | -0,04 | 0,490 | -0,83 | 0,522 |
| AR | Testosteron | 0,03 | 0,693 | 1,08 | 0,202 |
| | Vitamin D | 0,03 | 0,705 | -1,30 | 0,127 |
| | Osteokalcin | -0,09 | 0,185 | -1,48 | 0,081 |
| | Crosslaps | -0,16 | 0,015 | -1,26 | 0,134 |
| | SHBP | 0,04 | 0,517 | -0,26 | 0,761 |
| | Albumin | 0,09 | 0,150 | 0,34 | 0,684 |
| | E2 | 0,06 | 0,363 | -0,41 | 0,631 |
| | IGF | 0,04 | 0,560 | -0,40 | 0,638 |
| ER | Testosteron | 0,12 | 0,035 | 0,27 | 0,721 |

| | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| Vitamin D | -0,01 | 0,802 | 0,03 | 0,968 |
| Osteokalcin | -0,03 | 0,569 | 0,61 | 0,424 |
| Crosslaps | 0,04 | 0,461 | 0,40 | 0,602 |
| SHBP | -0,03 | 0,629 | 0,40 | 0,597 |
| Albumin | 0,06 | 0,294 | 0,84 | 0,267 |
| E2 | -0,13 | 0,018 | -0,41 | 0,585 |
| IGF | -0,03 | 0,579 | -0,96 | 0,207 |

β – standardizirani regresijski koeficijent

U sljedećem koraku analize korišteni su svi dostupni podaci kako bi se procijenila mogućnost predviđanja koštane gustoće temeljem svih podataka. Korišteno je stablo klasifikacije, a u model su istovremeno bili uključeni i genetski biljezi. Rezultati stabla klasifikacije za T-vrijednost ukazivali su na unos kalcija kao najvažniju varijablu, dok niti jedna druga varijabla nije imala dovoljno snažan učinak da bi se uvrstila u konačni model (Slika 4.4a). Pri tome je kao granica određena vrijednost od procijenjenih 850 mg kalcija na dan, koje je doprinosilo prosječnoj promjeni T-vrijednost od 0,5 jedinica (Slika 4.4a). Vrlo sličan rezultat s istom graničnom vrijednosti dobiven je i za QUI i BUA (Slika 4.4b), dok vrijednosti SOS nisu mogle biti predviđane korištenjem dostupnih podataka, tako da model nije bio izrađen.



Slika 4.4. Prikaz rezultata klasifikacijskog stabla koje je predviđalo a) T-vrijednost i b) QUI

U sljedećem koraku analize korišteni su svi podaci i uvršteni su u regresijski model u kojem su ultrazvučni pokazatelji koštane gustoće bili ovisne varijable, a ostali podaci neovisne. Rezultati su ukazivali na veliko značenje unosa kalcija i tjelesne aktivnosti na sve istraživane pokazatelje koštane gustoće, dok su rezultati analize genetskih biljega ukazivali na granično značajne rezultate samo za gen CYP19 (tablica 4.11).

Tablica 4.11. Prikaz razine statističke značajnosti za pojedine neovisne varijable u regresijskim modelima koji su predviđali vrijednosti pokazatelja koštane gustoće

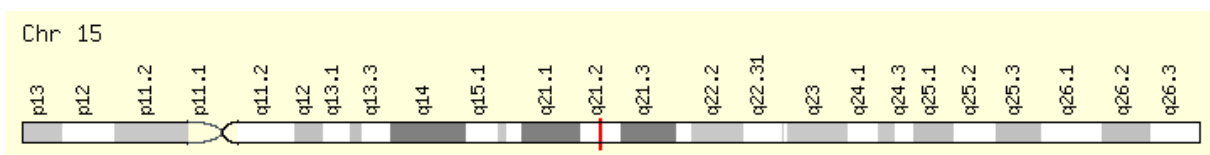
| Pokazatelj/čimbenik rizika | T-score | QUI | BMD | BUA | SOS |
|-------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| Dob | 0,508 | 0,343 | 0,413 | 0,454 | 0,580 |
| Spol | 0,694 | 0,666 | 0,674 | 0,750 | 0,599 |
| CYP19 | 0,078 | 0,039 | 0,049 | 0,162 | 0,096 |
| IGFI | 0,970 | 0,924 | 0,923 | 0,985 | 0,821 |
| AR | 0,482 | 0,540 | 0,462 | 0,587 | 0,623 |
| ER | 0,679 | 0,598 | 0,600 | 0,450 | 0,718 |
| Testosteron | 0,355 | 0,428 | 0,380 | 0,108 | 0,793 |
| Vitamin D | 0,742 | 0,974 | 0,938 | 0,905 | 0,928 |
| Osteokalcin | 0,381 | 0,365 | 0,348 | 0,025 | 0,728 |
| Crosslaps | 0,347 | 0,378 | 0,339 | 0,056 | 0,955 |
| SHBG | 0,151 | 0,105 | 0,140 | 0,092 | 0,395 |
| Albumin | 0,823 | 0,865 | 0,807 | 0,760 | 0,703 |
| E2 | 0,873 | 0,752 | 0,820 | 0,977 | 0,529 |
| IGF1nmolL | 0,347 | 0,325 | 0,350 | 0,069 | 0,856 |
| Indeks tjelesne mase | 0,959 | 0,855 | 0,870 | 0,139 | 0,234 |
| Unos kalcija | <0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,010 |
| Gazirana pića | 0,419 | 0,512 | 0,570 | 0,625 | 0,126 |
| Tjelesna aktivnost | 0,004 | 0,009 | 0,007 | 0,101 | 0,013 |
| Gledanje televizora | 0,220 | 0,195 | 0,142 | 0,234 | 0,622 |
| Korištenje kompjutera | 0,761 | 0,491 | 0,423 | 0,264 | 0,744 |
| Izlaganje suncu ljeti | 0,788 | 0,907 | 0,919 | 0,951 | 0,598 |
| Izlaganje suncu zimi | 0,208 | 0,277 | 0,267 | 0,531 | 0,358 |
| Prosječno dnevno trajanje sna | 0,291 | 0,312 | 0,299 | 0,230 | 0,468 |

5. RASPRAVA

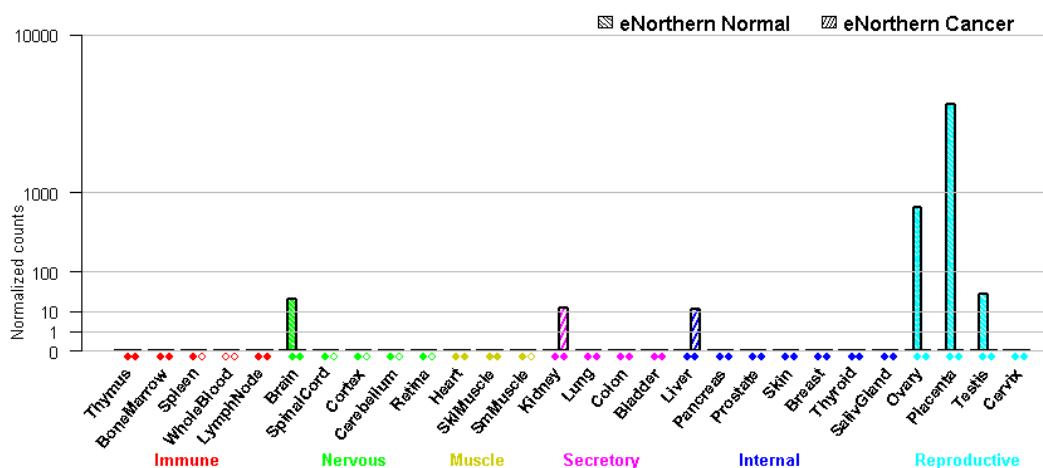
Glavni cilj ove disertacije bila je analiza odrednica mineralne gustoće kosti kod djece, koja je ukazala da su gen za aromatazu, unos kalcija, razina tjelesne aktivnosti glavne odrednice mineralne koštane gustoće.

5.1. GENETIČKE ODREDNICE MINERALNE KOŠTANE GUSTOĆE KOD DJECE

Ova disertacija zasnivala se na četiri genetska pokazatelja koji su prije bili opisivani kao regulatori ili čimbenici povezani s mineralnom koštanom gustoćom u odrasloj dobi, dok je njihovo značenje kod djece mnogo slabije poznato. Prvi od istraživanih gena bio je gen CYP19. Njegov proizvod je enzim P450-aromataza, koja je monooksigenaza, uključena u metabolizam kolesterola, steroida i drugih lipida. Protein se nalazi na endoplazmatskom retikulumu, i zadužen je za završni stadij sinteze estrogena. Mutacije ovog gena uzrokuju povećanje ili smanjenje aktivnosti proteina, što rezultira poremećajima koji su povezani s disbalansom spolnih hormona. Gen se nalazi na dugom kraku 15. kromosoma (slika 5.1), a ekspresijski profil sugerira kako je proteinski proizvod aktivan u spolnim tkivima, bubregu, jetri i mozgu (slika 5.2). Ovaj gen, tj. njegov protein je do sada povezan s nizom bolesti, od kojih se često spominju razne bolesti vezane uz spolne hormone, ali i poremećaje koštane gustoće (139) (tablica 5.1).



Slika 5.1. Prikaz 15. kromosoma i fizičke lokacije gena CYP19, na q21.2



Slika 5.2. Ekspresijski profil gena CYP19

Tablica 5.1. Prikaz najčešće objavljivanih članaka povezanih uz gen CYP19 u bibliografskoj bazi podataka PubMed (138)

| Bolest ili stanje | Snaga povezanosti | Broj članaka u PubMedu |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|
| Karcinom dojke | 92,00 | 2156 |
| Metastatski karcinom dojke | 83,56 | 101 |
| Karcinom endometrija | 75,45 | 111 |
| Endometrioza | 73,27 | 236 |
| Ginekomastia | 72,05 | 45 |
| Virilizacija | 66,75 | 18 |
| Tumor dojke | 66,44 | 132 |
| Endokrinološki poremećaji | 64,74 | 16 |
| Policistični jajnici | 64,09 | 16 |
| Koriokarcinom | 63,41 | 64 |
| Gubitak koštane mase | 63,00 | 69 |
| Tumori | 62,51 | 763 |
| Osteoporoza | 62,00 | 55 |

U prikazu snage povezanosti korišten je Novoseek pokazatelj (139), koji predstavlja sumarni broj koji pokazuje snagu povezanosti nekog gena i poremećaja.

Novoseek pokazatelj se računa na temelju otkrivanja znanja (engl. *data mining*), a koristi članke koji su objavljeni i indeksirani u bibliografskoj bazi podataka PubMed.

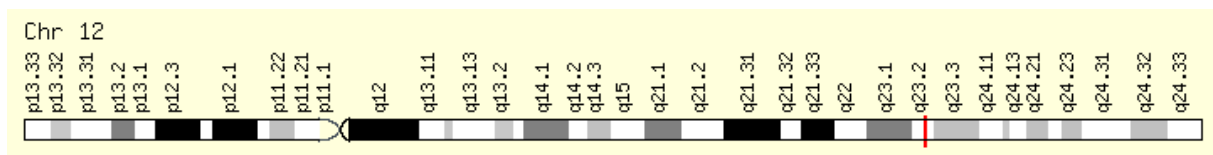
Unutar četvrtog introna gena CYP19 nalazi se mikrosatelitni lokus kojeg čini različiti broj ponavljanja sekvence TTTA. Polimorfizam unutar ove regije uzrok je promjena u sintezi estrogena koje mogu rezultirati različitom koštanom masom. Tako su prijašnja istraživanja povezivala ovaj gen s osteopenijom i izostalim zatvaranjem epifiznih pukotina, kao i drugim poremećajima koštane gustoće (140-144).

Rezultati ove disertacije ukazuju na moguću povezanost ovog gena s koštanom mineralnom gustoćom već kod djece, tako da su djeca sa srednje velikim brojem ponavljanja unutar ovog gena imala najlošiju koštanu gustoću, dok su djeca s malim i velikim brojem ponavljanja imala veću mineralnu koštanu gustoću. Ovaj rezultat bio je statistički značajan u aditivnom modelu, što ukazuje i na moguće međudjelovanje s drugim genima ili drugim mehanizmima koji mogu modelirati ili posredno biti povezani s koštanom gustoćom. Ovaj rezultat uklapa se u novije spoznaje u kojima je većina bolesti starije životne dobi zapravo uvjetovana vrlo malim genetskim učincima koji su u snažnoj vezi s okolišnim čimbenicima (145). Ovakve bolesti posebno se teško mogu istraživati kod djece, posebice jer se često radi o složenim odnosima raznih čimbenika, koji uključuju genetsko nasljeđe, okolišne rizike, čimbenike ponašanja, ali i moguće slučajne događaje.

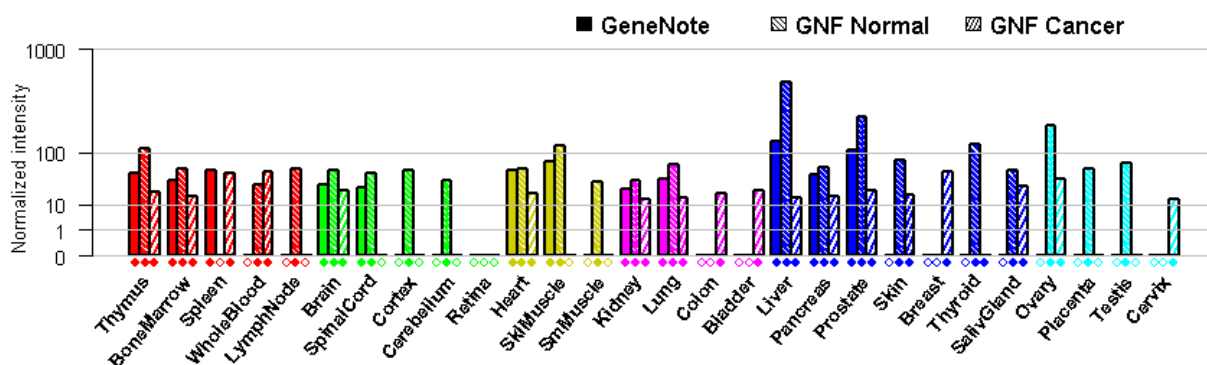
Snaga povezanosti gena CYP19 i mineralne koštane gustoće kod djece bila je izraženija u nekim fazama rasta. Ovaj rezultat ukazuje na moguće razdoblje u kojem je gen aktivan i ima snažni učinak na kost, dok se u drugim razdobljima taj učinak slabije iskazuje ili ga nema. Ovaj rezultat dodatno pokazuje složenost načina na koji su neki geni povezani sa svojstvom ili bolesti, ukazujući na moguću pojavu nejednake snage povezanosti u raznim razvojnim stadijima. Ovo je posebice zanimljivo u pubertetu jer se tada događaju mnoge endokrinološke promjene koje su već same po sebi složene i imaju raznoliko djelovanje na mineralnu koštanu gustoću. Stoga se kao preporuka budućih istraživanja treba navesti potreba za vrlo velikim povećanjem istraživanog uzorka (jer je složene pojave mnogo lakše prepoznati na vrlo velikim uzorcima), nužno detaljno određivanje stadija pubertalnog razvoja, a konačno i moguća provedba longitudinalnih istraživanja, koja bi mjerila mineralnu koštanu gustoću u raznim razvojnim stadijima, kako bi se mogla opisati dinamika povezanosti gena s mineralnom koštanom gustoćom.

Usporedba drugih istraživanih gena s koštanom gustoćom rezultirala je nepostojanjem statistički značajne povezanosti. Razlozi ovom mogli bi biti mnogostruki. Prvo, moguće je da neki od ovih gena pokazuju raznoliku povezanost s koštanom gustoćom, kako je već prikazano u primjeru gena CYP19. Drugo, moguće je da je učinak ovih gena na koštanu gustoću značajniji tijekom starije dobi, kada se koštana gustoća počne smanjivati.

Drugi od istraživanih gena bio je gen za IGF-1. Ovo je gen čiji je proizvod poznat i kao somatomedin C, polipeptidni spoj sličan inzulinu, koji ima važnu ulogu u rastu tijekom djetinjstva i ima anabolične učinke kod odraslih (146). Gen se nalazi na 12. kromosomu (slika 5.3), a njegova ekspresija poznata je iz gotovo svih istraživanih tkiva, čime se potvrđuje njegovo značenje u rastu i razvoju raznih tkiva, posebice u jetri, prostati i jajnicima (slika 5.4). Gen je do sada najčešće opisan u svezi s raznim poremećajima rasta, ali isto tako i u osteoporozu i poremećajima regulacije mineralne gustoće kosti (147) (tablica 5.2).



Slika 5.3. Prikaz 12. kromosoma i fizičke lokacije gena IGF-1, na q23.2



Slika 5.4. Ekspresijski profil gena IGF-1 (147)

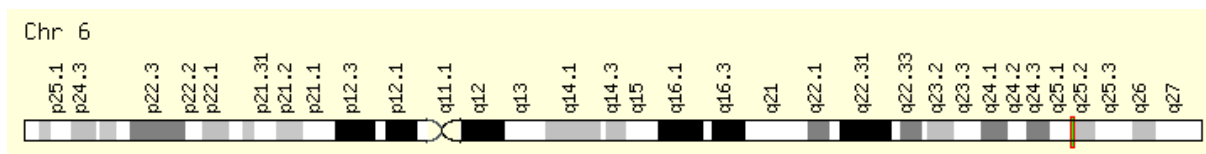
Tablica 5.2. Prikaz najčešće objavljivanih članaka povezanih uz gen IGF-1 u bibliografskoj bazi podataka PubMed (147)

| Bolest ili stanje | Snaga povezanosti | Broj članaka u PubMedu |
|--------------------------|-------------------|------------------------|
| Akromegalija | 95.20 | 858 |
| Laronov sindrom | 89.86 | 220 |
| Nedostatak hormona rasta | 89.33 | 167 |
| Nizak rast | 85.39 | 270 |
| Problemi rasta | 81.62 | 107 |
| Rezistencija na IGF-1 | 79.96 | 62 |
| Hipopituitarizam | 79.13 | 49 |
| Pituitarni adenom | 76.04 | 42 |
| Rezistencija na inzulin | 75.16 | 298 |
| Usporenje rasta | 74.00 | 133 |
| ... | | |
| Osteoporoza | 62.56 | 147 |
| Idiopatska osteoporoza | 62.55 | 36 |

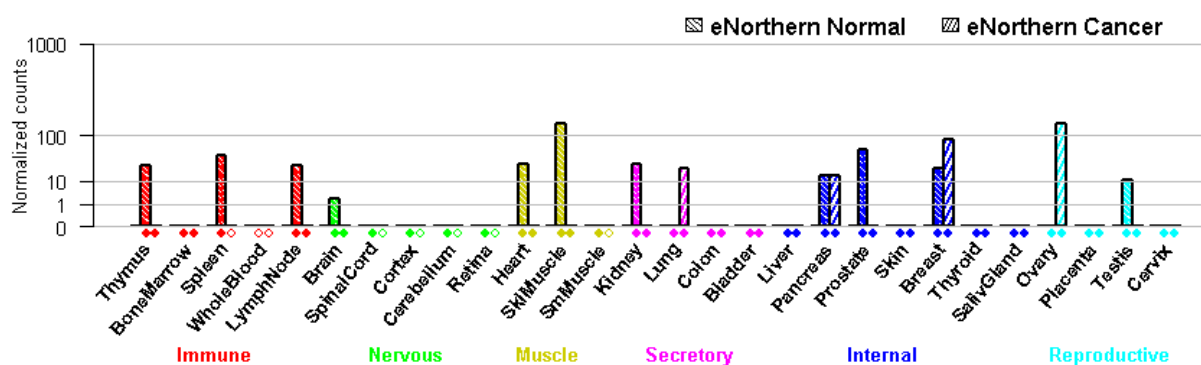
Rezultati ove disertacije nisu pokazali statistički značajnu povezanost gena s bilo kojim od istraživanih obilježja. Stoga bi se u zaključku moglo reći da na temelju istraživanog uzorka djece nije dokazana povezanost ovog gena i ultrazvučnih pokazatelja mineralne koštane gustoće.

Treći istraživani gen bio je receptor za estrogen, ER α . Ovo je jedan od elemenata skupine receptora koje aktivira estrogen, od kojih je zanimljiv receptor na jezgri stanice. Njegova glavna uloga je vezanje transkripcijskih čimbenika, čime regulira aktivnost DNK. Postoje dvije domene receptora, α i β , koje su nužne za aktivnost receptora. Gen koji je bio uključen u ovo istraživanje nalazi se na dugom kraku šestog kromosoma (Slika 5.5). Analiza ekspresije ukazuje na čestu aktivnost u imunološkim tkivima, mišićima, bubregu i plućima, ali i u reproduktivnom sustavu

(slika 5.6). Dosadašnja istraživanja najčešće su ovaj receptor povezivala s karcinomom dojke i drugim tumorima, a opisana je i povezanost s osteoporozom i poremećajima koštane gustoće (148) (tablica 5.3).



Slika 5.5. Prikaz 6. kromosoma i fizičke lokacije gena ER, na q25.2



Slika 5.6. Ekspresijski profil gena ER (148)

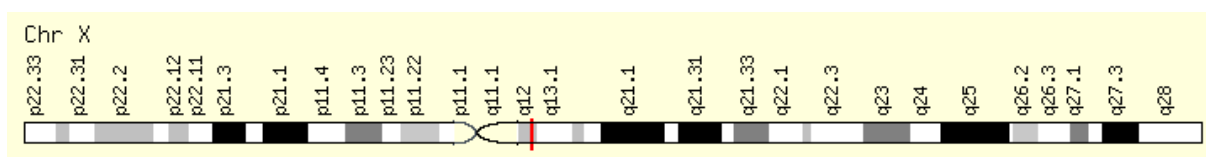
Tablica 5.3. Prikaz najčešće objavljivanih članaka povezanih uz gen ER u bibliografskoj bazi podataka PubMed (148)

| Bolest ili stanje | Snaga povezanosti | Broj članaka u PubMedu |
|----------------------------------|-------------------|------------------------|
| Karcinom dojke | 90.87 | 762 |
| Duktalni karcinom | 85.92 | 144 |
| Tumori | 85.09 | 4873 |
| Karcinom endometrija | 81.68 | 325 |
| ... | | |
| Osteoporoza | 76.47 | 243 |
| ... | | |
| Osteoporoza, postmenopauzalna | 72.83 | 71 |
| ... | | |
| Gubitak koštane mase | 58.88 | 43 |

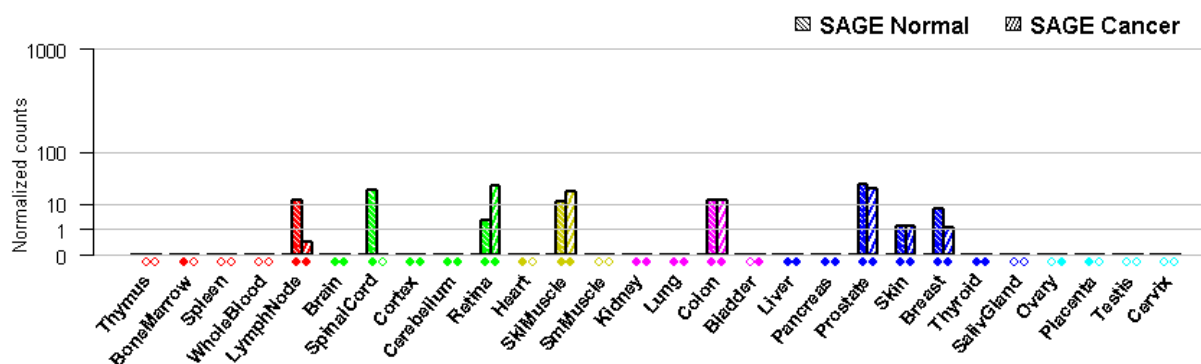
Rezultati ove disertacije nisu pokazali statistički značajnu povezanost receptora ER s uzv parametrima petne kosti u dječjoj dobi. Istovremeno, rezultati su pokazali da je ER bio statistički značajno povezan s razinom estrogena ($P=0,018$) i s razinom testosterona ($P=0,035$), što potvrđuje važnost ovog gena u regulaciji razine tih hormona.

Četvrti analizirani gen je gen za androgeni receptor, poznat i kao NR3C4. Gen se nalazi na dugom kraku kromosoma X, na lokaciji q12 (149) (slika 5.7). Analiza ekspresije ukazala je na aktivnost u imunološkim i živčanim tkivima, a najizraženija je aktivnost zabilježena u prostati, koži i dojci, ali isto tako i u debelom crijevu (slika 5.8). Proizvod ovog gena je androgeni receptor NR3C4 (engl. *nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4*). Ovo je jedan od receptora na jezgri stanice, koji aktivira vezivanje androgenih hormona, testosterona i dihidrotestosterona, a sličan je i progesteronskom receptoru, s kojim ponekad može imati križnu osjetljivost.

Dosadašnja istraživanja povezuju ovaj gen s raznim bolestima, ponajprije vezanih uz muške spolne hormone (150-152) (tablica 5.4).



Slika 5.7. Prikaz kromosoma X i fizičke lokacije gena AR, na q12.



Slika 5.8. Ekspresijski profil gena AR (149)

Tablica 5.4. Prikaz najčešće objavljivanih članaka povezanih uz gen AR u bibliografskoj bazi podataka PubMed (149)

| Bolest ili stanje | Snaga povezanosti | Broj članaka u PubMedu |
|---|-------------------|------------------------|
| Karcinom prostate | 93.05 | 1965 |
| Djelomični sindrom neosjetljivosti na androgene | 90.40 | 22 |
| Potpuni sindrom neosjetljivosti na androgene | 87.40 | 33 |
| Spinobulbar na mišićna atrofija | 78.76 | 11 |
| Virilizacija | 72.43 | 31 |
| Rekurentni karcinom prostate | 69.36 | 19 |

Glavna funkcija androgenog receptora je povezana s razvojem i održavanjem fenotipskih obilježja muškaraca (153). Osim ovoga, androgeni receptori su povezani i s drugim djelovanjima, poput izravnog međudjelovanja s DNK, koje je povezano s transportom nekih iona, a konačni učinak može biti i izravna fosforilacija DNK s rezultatom njezine aktivacije ili inaktivacije. Tako su neki oblici ovog receptora povezani i s nekoliko regulatora mišićnog rasta (154).

Međutim, novije spoznaje govore u prilog mnogo složenijoj prirodi nastanka osteoporoze uzrokovane genetskim čimbenicima. Ovakva istraživanja temelje se na cjelogenomskim analizama (engl. *genome-wide association study*), koje se zasnivaju na vrlo velikom broju genotipiziranih biljega, u pravilu oko 500 tisuća do milijun biljega (145). Cjelogenomska analiza ima mnogo prednosti. Prva od njih je nepostojanje nulte hipoteze, dakle neograničenost u predviđanju u shvaćanju nekog svojstva ili bolesti. Ova metoda jednostavno analizira povezanost istraživanog svojstva sa svim dostupnim biljezima, a na taj način pronalazi i moguće rezultate koji nisu bili očekivani, uključujući i pronalazak svih regulatornih mehanizama. Ovo se najbolje očituje primjerom za transporter mokraćne kiseline SLC2A9 (154). Mokraćna kiselina izlučuje se iz organizma pomoću prijenosnika URAT1, koji je smješten u bubrezima (155). Korištenje cjelogenomske analize pokazalo je da postoji transporter koji je sedam puta jači od do tada poznatog, URAT1, koji je otkriven korištenjem cjelogenomske analize.

Dosadašnja istraživanja osteoporoze korištenjem cjelogenomske analize pokazala su veliki broj genetskih biljega koji su uključeni u metabolizam kosti, koji do tada nisu bili otkriveni korištenjem uobičajenih istraživačkih metoda. Tako su do sada opisani geni na 8. kromosomu - *TNFRSF11B* (osteoprotegerin) i još jedan gen na 11. kromosomu - *LRP5* (low density lipoprotein-receptor-related protein) (156). Drugo slično istraživanje pronašlo je gen UGT2B17, koji je također povezan s osteoporozom (157). Međutim, ovdje se pokazuje i glavna mana cjelogenomskih istraživanja (145). Ovaj oblik istraživanja vrlo je snažan za istraživanje svojstava koje su podložne razvoju bolesti, a ne bolestima. Tako je statistička snaga detekcije gena mnogo manja ako se analizira binarno svojstvo (osteoporoza, da ili ne), nego ako se analizira kvantitativno svojstvo (mineralna gustoća kosti). Druga je mana cjelogenomskih analiza da je potreban jako veliki uzorak kako bi se dostigli statistički značajni rezultati, koji je u novije vrijeme gotov isključivo veći od 50.000 ispitanika

(145). Stoga je na budućim istraživanjima da ustanove dodatne gene koji su povezani s mineralnom koštanom gustoćom i osteoporozom, na temelju suradnje većeg broja stručnjaka i stvaranjem vrlo velikih uzoraka na kojima se provodi analiza podataka. Potrebno je i naglasiti kako cjelogenomska istraživanja do sada niti jednom nisu prikazala neke od uobičajenih gena, poput onih koji su istraživani u ovoj disertaciji, što dodatno ukazuje na složenu prirodu regulacije ovog svojstva i pojavu osteoporoze.

Genetski polimorfizmi imaju snažan učinak na mineralnu koštanu gustoću, a ranije objavljena istraživanja sugeriraju da je oko 50-85% varijabilnosti koštane gustoće pod genetskim utjecajem (158), što je još izraženije u mladosti (159). To potvrđuju i rezultati ove disertacije u usporedbi s rezultatima sličnog istraživanja provedenog na muškarcima, koje je pokazalo kako je CYP19 snažno povezan s koštanom mineralnom gustoćom (160).

5.2. OKOLIŠNE ODREDNICE MINERALNE KOŠTANE GUSTOĆE KOD DJECE

Jedan od glavnih rezultata ove disertacije je prikaz značenja unosa kalcija kao glavne odrednice mineralne koštane gustoće već u pubertalnoj dobi. Ovaj rezultat u skladu je s nizom istraživanja provedenih na odraslim ispitanicima, a potvrđuje značenje pravilne prehrane s dovoljnom količinom kalcija kao jedne od najvažnijih odrednica mineralne koštane gustoće. Ovaj rezultat već je poznat otprije (161), i potvrđuje veliku važnost održavanja pravilnog režima prehrane već u pre-pubertalnoj dobi, kao i prehrane majke tijekom trudnoće, koja se odražava čak do 16 godina kasnije na koštanoj mineralnoj gustoći adolescenata (162,163). Međutim, druga istraživanja često su prikazivala i učinak ostalih okolišno uvjetovanih ili modificiranih varijabli na mineralnu gustoću kosti, poput tjelesne aktivnosti, količine sna, gaziranih pića i izlaganja suncu (161-163). Među navedenim varijablama, rezultati ove disertacije potvrđuju i značenje tjelesne aktivnosti na stanje koštanog sustava, na način da je veća razina tjelesne aktivnosti bila povezana s boljom koštanom mineralnom gustoćom. Ovaj rezultat u skladu je s prijašnjim istraživanjima, koja povezuju smanjenje tjelesne aktivnosti s lošijim pokazateljima koštane gustoće (161,164). Tako je istraživanje provedeno na 500 djece ukazalo na pojavu snažne

povezanosti mineralne koštane gustoće lumbalnog područja kralježnice s unosom kalcija i tjelesnom aktivnosti, koje je bilo još snažnije izraženo među dječacima (161). U tom je istraživanju pokazano kako i stadij razvoja prema Tanneru ima snažan učinak na dinamiku razvoja koštane gustoće, što nažalost nije bilo dovoljno dobro mjereno u ovom istraživanju, tako da izravne usporedbe nisu bile moguće. Osim toga, to je istraživanje na raspolaganju imalo nešto drugačiji dizajn, koji je obuhvaćao djecu dobi od 4 do 20 godina, čime su imali mnogo veći opseg procjene pubertalnog razvoja i time su mogli dobiti bolji raspon stadija razvoja prema kojem su izradili krivulje dinamike rasta i razvoja mineralne koštane gustoće tijekom adolescencije (161). Isto istraživanje prikazuje rezultate u kojima se procjenjuje doprinos genetskih čimbenika na čak do 80% varijance, i navodi kako se ovdje radi o pogrešci jer su neki čimbenici mogli biti povezani i sa zajedničkim načinom života članova obitelji koji onda uzrokuje pogrešno povećanje procjene genetičkog doprinosa. Johnson i sur. pokazuju da doprinos genetskih čimbenika može varirati od 25% do 85% (165). Jedno drugo istraživanje prikazuje detaljne vrijednosti nasljedivosti za 13 područja kosti, izračunate na temelju blizanaca (166). Tako je nasljedivost koštane gustoće kostiju glave procijenjena na preko 95%, kuka 87-90% (ovisno o spolu), donjih udova 49-56%, zdjelica kod žena 68%, kod muškaraca 26%. Ove razlike su moguće povezano s metodološkim poteškoćama u procjeni nasljedivosti, koja se izražava kao postotak varijance nekog svojstva koji je pripisiv genetskim učincima. Naime, nasljedivost se izračunava na temelju procjene varijance okoliša i ukupne varijance nekog svojstva, a zatim se na temelju ovih razlika izračunava preostala varijanca koja se onda smatra postotkom učinka koji je pripisiv genetskim čimbenicima (145). Pri tome nasljedivost najviše ovisi o varijanci okoliša, na način da će u okolišima koji su raznolikiji varijanca okoliša biti veća, a kako je ukupan zbroj varijance okoliša i genetskih čimbenika najviše 100%, time postaje jasno kako će varijanca genetskih čimbenika, tj. nasljedivost biti manja u slučajevima raznolikijeg okoliša. Suprotno tome, nasljedivost će biti veća ako je mjerena u populaciji koja nema veliku raznolikost okoliša i izložena je sličnim učincima. Drugi problem procjene nasljedivosti je učinak zajedničkog okoliša (145). Naime, članovi jedne obitelji ne dijele samo genetski materijal, nego dijele i neke životne navike, poput prehrane, ali i drugih navika. Stoga je u procjeni nasljedivosti moguće krivo procijeniti doprinos genetskih čimbenika ako se ne koriste modeli koji procjenjuju i udio varijance koji nastaje zbog ne-genetskih učinaka zajedničkog okoliša. Tijekom provedbe ove

disertacije nije pronađeno niti jedno istraživanje koje u obzir uzima i zajednički okoliš s ciljem kvantifikacije njegovog učinka, što ukazuje na probleme u procjeni nasljedivosti i njezinu moguću nepreciznost.

Pregled Cochrane Review baze podataka ukazao je na nekoliko istraživanja vezanih uz mineralnu koštanu gustoću. Jedno od njih bilo je istraživanje učinka nadomjesnog kalcija u dječjoj dobi (166). Istraživanje je provedeno s ciljem odgovora na pitanje učinka nadomjesne terapije kalcijem kod djece i zadržavanja pozitivnog učinka unosa kalcija na mineralnu koštanu gustoću. Provedeno je pregledom baza podataka CENTRAL, (Cochrane Central Register of Controlled Trials), MEDLINE (1966. do 2005.), EMBASE (1980. do 2005.), CINAHL (1982. do 2005.), AMED (1985. do 2005.), MANTIS (1880. do 2005.) ISI Web of Science (1945. do 2005.), Food Science and Technology Abstracts (1969. do 2005.) i Human Nutrition (1982. do 2005.), uz dodatno pretraživanje nekoliko izvora kongresnih sažetaka. U istraživanje su bili uključeni randomizirani klinički pokusi, uspoređeni s placebo, koji su trajali barem tri mjeseca, kod zdrave djece. Pronađeno je 19 takvih istraživanja, u koja je bilo uključeno 2.859 djece. Glavni rezultati pokazali su kako nadomjesna terapija kalcijem nije bila povezana s mineralnom koštanom gustoćom vrata bedrene kosti ili lumbalnog područja kralježnice (166). Nadomjesni kalcij imao je mali pozitivan učinak na mineralnu koštanu gustoću cijelog tijela, ali je doprinio s 1,7% varijance, koja ima procijenjeni učinak od 0,1-0,2% smanjenja rizika lomova kosti godišnje. Jedini učinak imao je na kosti gornjih udova, stoga autori na temelju dostupnih rezultata zaključuju kako nadomjesni kalcij tijekom djetinjstva nema snažan klinički učinak (167). Iako rezultati ovog istraživanja pokazuju kako nadomjesni kalcij nije bio povezan s mineralnom koštanom gustoćom, moguće je da se u nekim obiteljima koje koriste prehranu s više kalcija kod djece zadrže neki oblici te prehrane, koji kasnije održavaju stalni povećani unos kalcija i time imaju pozitivan učinak na mineralnu gustoću kosti.

Nepostojanje drugih statistički značajnih rezultata moguća je posljedica male veličine uzorka, složene prirode istraživačkog pitanja ili mogućih problema prilikom prikupljanja podataka. Bez obzira na ove poteškoće, glavni sažeti zaključak okolišnih učinaka na koštanu gustoću mogao bi se svesti na dvije osnovne varijable (unos kalcija i tjelesna aktivnost), uz osvrt na varijable koje su bile povezane s koštanom

gustoćom u drugim istraživanjima. Temeljem ovih spoznaja, moguće je predložiti i programe intervencije s ciljem poboljšanja mineralne koštane gustoće kod djece. Takav program mogao bi se provoditi na djeci koja još nisu niti ušla u pubertet, a njegovo bi značenje moglo biti vrlo dugoročno. Osnovica takvog programa bila bi na dostatnom unosu kalcija, putem promicanja konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda, koje bi bilo u bliskoj vezi s poticanjem tjelesne aktivnosti kod djece. Ovakav programa bio bi u skladu i sa smjernicama za smanjenje prekomjerne tjelesne težine kod djece, čime bi provedba jednog ovakvog programa mogla biti višestruko korisna. U program bi svakako trebalo uključiti i roditelje, a njima savjetovati kako mogu poduprijeti provedbu aktivnosti sa svoje strane.

5.3. OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA

Jedno od glavnih ograničenja ove disertacije je presječna priroda istraživanja, koje se temeljilo na samo jednom ultrazvučnom mjerenju mineralne koštane gustoće. Tijekom tog mjerenja su u istraživanje bila uključena djeca oba spola, slične dobi, ali u raznim stadijima pubertalnog razvoja. Tako je odmah u početku u istraživanju bila prisutna visoka razina varijabilnosti. Drugi glavni problem istraživanja je visoka razina varijabilnosti genotipova, koji bi u slučaju analize genotipskog utjecaja na koštanu mineralnu gustoću rezultirale stvaranjem više od 40 skupina u analizi npr. gena za estrogenski receptor. Stoga je analiza bila usmjerena na analizu alelnih učinaka, koji su provedeni korištenjem dva modela koji su se zasnivali na pretpostavci linearnog i aditivnog učinka. Pri tome je za dva gena zabilježen aditivni nelinearni učinak, koji je bio izraženiji za CYP19. Jedno od ograničenja istraživanja je vezano i uz način procjene pubertalnog stadija razvoja, koji se kod djevojčica zasnivao na dva obilježja, a kod dječaka samo na jednom, tako da je opseg informativnosti kod dječaka bio nešto manji, što je dodatno povećavalo varijabilnost rezultata. Korištenje upitnika moglo je također biti mogući izvor pogreške, posebice u slučajevima da su djeca davala društveno poželjne odgovore, poput mogućeg smanjivanja vremena koje provedu ispred televizora ili računala. Bez obzira na moguće probleme, anketom je pokazano kako je glavni prediktor mineralne koštane gustoće unos kalcija, što se slaže s pretpostavkama i nekim literaturnim nalazima.

Drugi veliki problem je raznolikost uzorka, koji se sastojao od djece koja su bila u raznim stadijima pubertalnog razvoja. Čak niti korištenje podatka o razini

pubertalnog razvoja među djecom nije značajnije mijenjalo rezultat istraživanja, tako da zbog metodoloških problema prilikom prikupljanja podataka ovo nije uzeto u obzir u analizi. Stoga bi se kao preporuka budućih istraživanja trebalo naglasiti da je potrebno sakupiti djecu koja su u istom stadiju pubertalnog razvoja i provesti ovakvo istraživanje samo među njima, kako bi se dobio sličniji uzorak i samim time i reprezentativniji rezultati istraživanja.

Kao idealan model za buduće istraživanje ove teme postavlja se cjelogenomsko (engl. *genome-wide association*) istraživanje sa serijskim mjerenjima mineralne koštane gustoće. Ovakav oblik istraživanja u znatnoj bi mjeri mogao poboljšati metodološki okvir za shvaćanje dinamike razvoja kosti tijekom puberteta. Konačno, istraživanje genetske podloge mineralne koštane gustoće trebalo bi provesti na mješovitim uzorcima odraslih i djece (ili još bolje u prospektivnom obliku istraživanja koje bi obuhvatilo djecu u dobi od 10 godina a zatim bilo ponovljeno u dobi od 15, 20 i 25 godina), kako bi se bolje shvatile odrednice koje djeluju tijekom pubertalnog razvoja i kasnije u odrasloj dobi. Uz to bi se mogla provesti usporedba mjerene koštane gustoće korištenjem ultrazvuka i DEXA metode, koja bi omogućila i shvaćanje mogućih razlika u dinamici mjerene mineralne koštane gustoće i one koja je procijenjena na temelju mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.

6. ZAKLJUČAK

Provedbom istraživanja o povezanosti genetskih polimorfizama i mineralne koštane gustoće kod djece kao glavni zaključci postavljaju se:

- sekvence TTTA unutar gena CYP19 imala su nižu vrijednost uzv parametara gustoće kosti
- utjecaj gena CYP19 na uzv parametre kosti bio je statistički značajan i u regresijskom modelu koji je kontrolirao utjecaje mnogih drugih okolišno uvjetovanih varijabli
- utjecaj drugih analiziranih gena: IGF-1, gena za androgeni receptor i gena za ER nije bio značajan
- unos kalcija i razina tjelesne aktivnosti imaju pozitivan učinak na uzv parametre kosti u djece

7. SAŽETAK

Cilj ove disertacije bio je istražiti povezanost mineralne koštane gustoće kod djece s genetskim polimorfizmima. Disertacija je provedena na uzorku od 168 djece (85 djevojčica i 83 dječaka). Analizirani su učinci četiri gena na mineralnu koštanu gustoću: aromataze, IGF-1, receptora za estrogen i receptora za androgen. Osim ovoga, za svakog je ispitanika prikupljen i niz podataka iz ankete, koji su obuhvaćali prehrambene navike, kao i druge oblike ponašanja koji su povezani s koštanom gustoćom. Rezultati su ukazali na statistički značajnu povezanost mineralne koštane gustoće kod djece s genom za aromatazu CYP19, unosom kalcija i količinom tjelesne aktivnosti. Ovo potvrđuje složenu prirodu mineralne koštane gustoće i upućuje na mogućnost provedbe intervencijskog programa koji bi za cilj imao povećanje mineralne koštane gustoće kod djece, sve s ciljem smanjivanja šanse za nastanak osteoporoze i drugih štetnih posljedica smanjenja mineralne koštane gustoće.

8. SUMMARY

The association of ultrasonography indicators of the pediatric bone mineral density and genetic polymorphisms

The aim of this study was to investigate the association of the bone mineral density in children with genetic polymorphisms. The sample consisted of 168 children (85 girls and 83 boys). Four polymorphisms were analysed – aromatase, IGF-1, estrogen receptor and androgen receptor. Furthermore, for each examinee a survey was used to estimate dietary habits and other possible behavioural patterns associated with bone mineral density. The results indicated significant association of CYP19 aromatase with bone mineral density, as well as significant association of BMD with calcium intake and physical activity. This confirms the complex nature of the bone mineral density determination and suggests the potential targets for intervention program which would be aimed at reducing the risks of developing osteoporosis and other adverse outcomes related to reduction of bone mineral density.

9. LITERATURA

1. Urist MR. Fundamental and Clinical Bone Physiology. Lippincot, 1980.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Basic histology, text and atlas. 10th ed. Zagreb, Školska knjiga, 2005.
3. Cooke AM. Osteoporosis. Lancet 1995;1:878-82;929-937.
4. Favus MJ, ed.,Primer of the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism,4th edn. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 1999.
5. Eastoe JE. Chemical aspects of the matrix concept in calcified tissue organization. Calcif Tissue Res 1968; 2:1-6.
6. Marks SC, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. In: Principles of Bone Biology, 2nd ed.,vol. 1. Academic Press 2002; pp,33-58.
7. Stevens A, Lowe J. Histology.London: Mosby; 1992.
8. Halstead B, Middleton J. Bare bones, an explanation in art and science. Edinburg: Oliver and Boyd; 1972.
9. Jaworski ZGF. Proceedings of the first workshop on bone morphometry.Ottawa: University of Otawa Press; 1973:3-7.
10. Rubin CT, Rubin JE. Biology, physiology and morphology of bone. In: Ruddy s, Harris ED, Sledge CB, eds. Textbook of rheumatology, 6th edn.Philadelphia: W B Saunders; 2001; 1611-1634.
11. Baron R. Antomy and ultrastructure of bone. In: Favars MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Kelseyville: American Society of Bone and Mineral Research; 1990; 3-7.
12. Termine JD. Bone matrix proteins and the mineralization proces. In: Favars MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Kelseyville: American Society of Bone and Mineral Research; 1990; 6-18.
13. Borovečki F, Pećina-Slaus N, Vukičević S. Biological mechanisms of bone and cartilage remodeling genomic perspective. Int Orthop 2007;31:799-805.
14. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three-dimensional reconstruction of remodeling seqence in normals an metabolic bone diseases. Endocrinol Rev 1986;7:379-408.

15. Black D, Duncan A, Robins SP. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1988;169:197-203.
16. Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987;262:9702-9708.
17. Gheron P, Robey P. The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18:859-902.
18. Hauschka PV, Reid ML. Vitamin K-dependence of calcium binding protein containing gamma carboxyglutamic acid in developing chick bone. *J Biol Chem* 1978;253:9063-9068.
19. Geusens P, Vanderschueren D, Verstraeten A et al. Short-term course of 1,25(OH)₂D₃ stimulates osteoblasts but not osteoclasts in osteoporosis and osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991;49:168-173.
20. Price PA. Vitamin K-dependent bone proteins. In: Cohn HV et al., eds. *Calcium regulation and bone metabolism: basic and clinical aspects*. Vol.9. Amsterdam: Elsevier Science 1987;419-425.
21. Herring GM. Studies on the protein-bound chondroitin sulphate of bovine cortical bone. *Biochem J* 1968;107:41-49.
22. Mohan S, Baylink D. bone growth factors. *Clin Orthop Rel res* 1991;263: 30-48.
23. Margolis RN, Canalis E, Partridge NC. Anabolic hormones in bone: Basic research and therapeutic potential. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:872-877.
24. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
25. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factors and their binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999;20:761-787.
26. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1998;122:254-260.
27. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997;138: 3849-3858.
28. Canalis E. Update in new anabolic therapies for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1496-504.

29. Grinspoon S, Thomas L, Miller K, Herzog D, Klibanski A. Effects of recombinant human IGF-I and oral contraceptive administration on bone density in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2883-2891.
30. Barret-Connor E, Goodman-Gruen D. Gender differences in insulin-like growth factor and bone mineral density association in old age: The Rancho Bernardo study. *J Bone Miner res* 1998;13:1343-1349.
31. Rosen CJ, Dimai HP, Vereault D, Donahue LR, Beamer WG, Farley j, Linkhart S, linkhart T, Mohan S, Baylik DJ. Circulating and skeletal insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations i two inbred strains of mice with different bone mineral densities. *Bone* 1997;21:217-223.
32. Delany AM, Durant D, Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 2001;15:1781-1789.
33. Gangji V, Rydzziel S, Gabbitas B, Canalis E. Insulin-like growth facotr II promoter expression in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone. *Endocrinology* 1998;139:2287-2292.
34. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonost and skeleton. *Endocr Rew* 2003;24:218-235.
35. Martinovic S, Mazic S, Kisic V, Basic N, Jakic-Razumovic J, Borovecki F, Batinic D, Simic P, Grgurevic L, Labar B and Vukicevic S. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Stromal Cells from Human Bone Marrow Long-term Culture *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2004;Volume 52 (9): 1159-1167.
36. Martinovic S, Borovecki F, Miljavac V, Kisic V, Maticic D, Francetic I, Vukicevic S. Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation, *Arch Histol Cytol*. 2006 Mar;69(1):23-36.
37. Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenic protein-2, -4, and -6 on differentiation af rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology* 1995; 136:2671-2677.
38. Kretzschmar M, Massague J. Smads: mediators and regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:103-111.
39. Baird A, Ornitz DM. Fibroblast growth factors and their receptorsd. In: Canalis E (ed.) *Skeletal Growth Factors*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA 2000; pp. 167-178.

40. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1418-1428.
41. Marie PJ, Lomri A, Debiais F, Lemonnier J. Fibroblasts growth factors and osteogenesis. In: Canalis E (ed.) *Skeletal Growth Factors*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA 2000; pp.179-196.
42. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, Hurley MM. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 2000;105:1085-1093.
43. Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Sibanushi T, Nigi H, Tagawa M, Fukumoto S, Matsumoto T. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factors in rats. *Endocrinology* 1995;136:1276-1284.
44. Lowe HC, Raffy La, Collins T, Khachigian LM. Biology of platelet-derived growth factor. In: Canalis E (ed.) *Skeletal Growth Factors*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA 2000; pp. 129-151.
45. Hock JM, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994;134:1423-1428.
46. Javed A, Barnes GL, Jassanya BO, Stein JL, Gerstenfeld L, Lian JB, Stein GS. Runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: Evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol cell biol* 2001;21:2891-2905.
47. De La Piedra C, Diaz Martin MA, Diaz Diego EM et al. Serum concentrations of carboxyterminal cross-linkled telopeptide of type I collagen (ICTP), serum tartrate resistant acid phosphatase, and serum levels of intact parathyroid hormone in parathyroid hyperfunction. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:11-15.
48. Gutierrez S, Javed A, Tennant D van Rees M, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Lian JB. CCAAT/ enhancer-binding proteins (C/EBP) β and δ Activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem* 2002;277:1316-1323.
49. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. The osteoblast-specific transcription

- factor Cbfa 1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J. Biol Chem* 2000;275:25163-25172.
50. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM; Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is target of Cbfa 1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999;19:4431-4442.
 51. Kream BE, Lukert BP. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. In: Bliezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds.) *Principles of Bone Biology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 723-740.
 52. Blumsohn A, Hannon RA, Eastell R. Long-term retest-reliability of biochemical markers of bone turnover in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1998;9:135-142.
 53. Frost HM. Dynamic of bone remodeling. In: *Bone Biodynamics*. Little and Brown, Boston, MA, USA. 1964; pp. 315.
 54. Riggs BL, Wahner HW, Melton LJ III, Richelson LS, Judd HL, Offord KP. Rates of bone loss in the axial and appendicular skeletons of women: Evidence of substantial vertebral bone loss prior to menopause. *J Clin Invest* 1986;77:1487-1491.
 55. Riggs BL, Melton LJ III. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986;314:1676-1686.
 56. Parfitt AM, Mathews CHE, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis: Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 1983;72:1396-1409.
 57. Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signaling. *Nature* 1995;374: 363-366.
 58. Vortkamp A, Lee k, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273:613-622.
 59. St Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999;13:2072-2086.
 60. Sperling MA. *Pediatric Endocrinology*, Saunders, Philadelphia, 1996.

61. Trotter M, Hixon BB. Sequential changes in weight, density, and percentage ash weight of human skeletons from an early fetal period through old age. *Anat Rec* 1974;179:1-18.
62. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA. A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to one mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 1999;14:1672-1679.
63. Riggs BL; Wahner HW, DunnWL, Mazes RB, Offord KP, Mellon LJ. Differential changes in bone mineral density of the appendicular skeleton with aging. *J Clin Invest* 1981;67:328-335.
64. Mora S, Goodman WG, Loro ML, Roe TF, Sayre J, Gilsanz V. Age-related changes in cortical and cancellous vertebral bone density in girls: Assessment with quantitative CT. *AJR Am J Roentgenol* 1994;162:405-409.
65. Gilsanz V, Gibbens DT, Carlson M, Boechat MI, Cann CE, Schulz EE. Peak trabecular vertebral density: A comparison of adolescent and adult females. *Calcif. Tissue Int* 1988;43:260-262.
66. Mauras N, Haymond MW, Darmaun D, Vieira NE, Abrams SA, Yergey A. Calcium and protein kinetics in prepubertal boys – positive effects of testosterone. *J Clin Invest* 1994;93:1014-1019.
67. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC, Bonjour JP. 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;75:1060-1065.
68. Marcus R, Kosen J, Pfefferbaum A, Horning A. Age-related loss of trabecular bone in premenopausal women: A biopsy study. *Calcif Tiss Int* 1983;35:406-409.
69. Mosekilde L. Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure – biomechanical consequences. *Bone* 1989;10:425-432.
70. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type 1 and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763-8.

71. Eastell R. Osteoporosis. U: Wass JAH, Shalet SM. Oxford text book of endocrinology and diabetes. Oxford University Press, Oxford, UK 2002, str., 656-75.
72. Gilsanz V, Gibbens DT, Carslon M i sur. Peak trabecular vertebral density: a comparison of adolescent and adult females. *Calcif Tissue Int* 1988;43:260-2.
73. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B i sur. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:555-63.
74. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL i sur. 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.
75. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ i sur. 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.
76. Seeman E, Hopper JL, Bach LA i sur. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989;320:554-8.
77. Evans RA, Marel GH, Lancaster EK i sur. Bone mass is low in relatives of osteoporotic patients. *Ann Intern Med* 1988;109:870-3.
78. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW i sur. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989;44:429-3.
79. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL i sur. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987;80:706-10.
80. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F i sur. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 1995;12:2017-22.
81. Harris M, Nguyen TV, Howard GM i sur. Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone* 1998;22:141-5.
82. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M i sur. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int* 1996;6:178-82.

83. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC Jr. Genetic determinants of bone mass in daughters adult women: A reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction with heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991;6:561-567.
84. Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO, Bonjour JP. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphism? *J Bone Mineral Res* 1998;13:363-370.
85. Ferrari SL, Rizzoli R, Manen D, Slosman DA, Bonjour JP. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: Interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphism. *J Bone Mineral Res* 1998;13:925-930.
86. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal girls. *N Engl J Med* 1997;337:77-82.
87. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of collagen type 1 α 1 gene polymorphism with bone density in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:853-855.
88. Gunnes M, Berg JP, Hasle J, Lehmann EH. Lack of relationship between vitamin D receptor genotype and forearm bone gain in healthy children, adolescents, and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:851-855.
89. Bell NH, Shary J, Stevens J i sur. Demonstration that bone mass is greater in black than in white children. *J Bone Miner Res* 1991;6:719-23.
90. Southard RN, Morris JD, Mahan JD i sur. Bone mass in healthy children: measurements with quantitative DXA. *Radiology* 1991;179:735-8.
91. Gilsanz V, Skaggs DL, Kovanlikaya A i sur. Differential effect of race on the axial and appendicular skeletons of children. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1420-7.
92. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC i sur. Bone mineral acquisition in healthy asian, hispanic, black and caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4702-12.
93. Janz KF, Burns TL, Torner JC i sur. Physical activity and bone measures in young children: The Iowa bone development study. *Pediatrics* 2001;107:1387-93.

94. Prentice A, Laskey MA, Shaw J, Cole TJ, Fraser DR. Bone mineral content of Gambian and British children aged 0-36 months. *Bone Miner*1990;10:211-224.
95. Patel DN, Pettifor JM, Becker PJ, Grieve C, Leschner K. The effect of ethnic group on appendicular bone mass in children. *J Bone Mineral Res*1992;7:263-272.
96. Southard RN, Morris JD, Mahan JD, Hayes JR, Torch MA, Sommer A, Zipf WB. Bone mass in healthy children: Measurement with quantitative DXA. *Radiology* 1991;179:735-738.
97. Kleerekoper M, Nelson DA, Flynn MJ, Pawluszka AS, Jacobsen G, Peterson EL. Comparison of radiographic absorptiometry with dual energy x-ray absorptiometry and quantitative computed tomography in normal older white and black women. *J Bone Mineral Res* 1994;9:1745-1750.
98. Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, Levine LS, Fedun B, Wang J, Pierson RN, Jr, Leibel RL. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2509-2518.
99. Koo WWK, Massom LR, Walters J. Validation of accuracy and precision of dual energy x-ray absorptiometry for infants. *J Bone Miner Res* 1995;10:1111-1115.
100. Nelson DA, Koo WWK. Interpretation of bone mass measurements in the growing skeleton. *Calcif Tissue Int* 1995;65:1-3.
101. del Rio L, Carrascosa A, Pons F, Gusinyé M, Yeste D, Domenech F. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: Changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res* 1994;35:362-366.
102. Faulkner RA, Bailey DA, Drinkwater DT, McKay HA, Arnold C, Wilkinson AA. Bone densitometry in Canadian children. *Calcif Tissue Int* 1996;59:344-351.
103. Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ, Delmas PD. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: Correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1330-1333.
104. Kröger H, Kotaniemi A, Vainio P, Alhava E. Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy x-ray absorptiometry. *Bone Miner* 1990;17:75-85.

105. Braillon PM, Salle BL, Brunet J, Glorieux FH, Delmas PD, Meunier PJ. Dual energy x-ray absorptiometry measurement of bone mineral content in newborns: Validation of the technique. *Pediatr Res* 1992;32:77-80.
106. Koo WW, Walters J, Bush AJ. Technical considerations of dual-energy x-ray absorptiometry-based bone mineral measurements for pediatric subjects. *J Bone Miner Res* 1995;10:1998-2004.
107. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, Marcus R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol (Oxf) Metab* 1991;73:1332-1339.
108. Zanchetta JR, Plotkin H, Alvarez-Filgueira ML. Bone mass in children: Normative values for the 2-20-year-old population. *Bone* 1995;14:3S-399S.
109. Lu PW, Cowell CT, Lloyd-Jones SA, Brioy JN, Howman-Giles R. Volumetric bone mineral density in normal subjects, aged 5-27 years. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1586-1590.
110. Gilsanz V, Boechat MI, Gilsanz R, Loro ML, Roe TF, Goodman WG. Gender differences in vertebral body sizes in children and adolescents. *Radiology* 1994;190:673-677.
111. Hangartner TN, Gilsanz V. Evaluation of cortical bone by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1996;11:1518-1525.
112. Kovanlikaya A, Loro ML, Hangartner TN, Reynolds RA, Roe TF, Gilsanz V. Osteopenia in children: CT assessment. *Radiology* 1996;198:781-784.
113. Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM i sur. Ultrasonographic heel measurement to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet* 1996;348:5511-4.
114. Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporos Int* 2000;11:321-30.
115. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D. Childhood growth, physical activity, and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res* 1995;10:940-947.
116. Janz KF, Burns TL, Torner JC, Levy SM, Paulos R, Willing MC, Warren JJ. Physical activity and bone measures in young children: The Iowa bone development study. *Pediatrics* 2001;107:1387-1393.

117. Sundberg M, Gardsell P, Johnell O, Karlsson MK, Ornstein E, Sandstedt B, Sernbo I. Peripubertal moderate exercise increases bone mass in boys but not in girls: A population-based intervention study. *Osteoporosis Int* 2001;12:152-57.
118. Morel J, Combe B, Francisco J i sur. Bone mineral density of 704 amateur sportsmen involved in different physical activities. *Osteoporos Int* 2001;12:152-7.
119. Puntilla E, Kroger H, Lakke T i sur. Physical activity in adolescence and bone density in peri- and postmenopausal women: a population based study. *Bone* 1997;21:363-7.
120. Matkovic V, Kostial K, Simonovic I i sur. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 1979;32:540-9.
121. Heaney RP. Calcium in the prevention and treatment of osteoporosis. *J Intern Med* 1992;231:169-180.
122. Lloyd T, Andon MB, Rollings N i sur. Calcium supplementation and bone mineral density in adolescent girls. *JAMA* 1993;270:841-4.
123. Johnston CC, Miller JZ, Slemenda CW i sur. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N Engl J Med* 1992;327:82-7.
124. Bonjour JP, Carrie AL, Ferrari S i sur. Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Invest* 197;9:1287-94.
125. Lee WTK, Leung SSF, Leung DM Chenh JC. A follow-up study on the effects of calcium-supplement withdrawal and puberty on bone acquisition in children. *Am J Clin Nutr* 1996;64:71-77.
126. Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM i sur. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1987;106:354-61.
127. Hergenroeder AC. Bone mineralization, hypothalamic amenorrhea, and sex steroid therapy in female adolescents and young adults. *J Pediatr* 1995;126:683-9.
128. 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.
129. Frank GR. The role of estrogen in pubertal skeletal physiology: Epiphyseal maturation and mineralization of the skeleton. *Acta Paediatr* 1995;84:627-30.

130. Abu EO, Horner A, Kusec V i sur. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3493-7.
131. Carani C, Qin K, Simoni M i sur. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997;337:91-5.
132. Morishima A, Gumbach MM, Simpson ER i sur. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689-98.
133. Smith EP, Boyd J, Frank GR i sur. Estrogen resistance caused by a novel mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331:1056-61.
134. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.
135. Mora S, Pitukcheewanont P, Nelson JC i sur. Serum levels of insulin-like growth factor-I and the density, volume and cross-sectional area of bone in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2780-3.
136. Boot AM, Engels MA, Boerma GJ i sur. Changes in bone mineral density, body composition and lipid metabolism during growth hormone (GH) treatment in children with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3150-4.
137. Mardešić D et al. *Pedijatrija. Školska knjiga, Zagreb, 2003.*
138. Falconer DS, Mackay TFC. *Introduction to Quantitative Genetics. Fourth edition. Addison Wesley Longman, Harlow, Essex, UK, 1996.*
139. GeneCards. Aromatase. Dostupno an adresi: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP19A1> (datum pristupa 16.10.2009).
140. Taxel P, Kennedy DG, Fall PM, Willard AK, Clive JM, Raisz LG. The effect of aromatase inhibition on sex steroids, gonadotropins, and markers of bone turnover in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2869-74.
141. Lester J, Coleman R. Bone loss and the aromatase inhibitors. *Br J Cancer*. 2005 Aug;93 Suppl 1:S16-22.
142. Ravdin PM. Managing the risk of osteoporosis in women with a history of early breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2004 Oct;18(11):1385-90.
143. Tofteng CL, Kindmark A, Brändström H, Abrahamsen B, Petersen S, Stiger F, Stilgren LS, Jensen JE, Vestergaard P, Langdahl BL, Mosekilde L; Danish Osteoporosis Prevention Study. Polymorphisms in the CYP19 and AR genes--

- relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcif Tissue Int.* 2004 Jan;74(1):25-34.
144. Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kröger H, Komulainen M, Pallonen H, Saarikoski S, Honkanen R, Mäenpää PH Relation of aromatase gene polymorphism and hormone replacement therapy to serum estradiol levels, bone mineral density, and fracture risk in early postmenopausal women. *Ann Med.* 2003;35(4):282-8.
 145. Wright A, Hastie N. *Genes and common diseases.* Cambridge University Press, 2007, 544 str.
 146. Butler AA, Yakar S, LeRoith D (2002). "Insulin-like growth factor-I: compartmentalization within the somatotrophic axis?". *News Physiol. Sci.* 17: 82–5.
 147. GeneCards. IGF-1. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IGF1> (datum pristupa 16.10.2009).
 148. GeneCards. ESR1. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ESR1> (datum pristupa 16.10.2009).
 149. GeneCards. AR. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AR> (datum pristupa 16.10.2009).
 150. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006;58(4): 782–97.
 151. Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B. Regulation of androgen action. *Vitam. Horm.* 1999;55: 309–52.
 152. Raudrant D, Rabe T. Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* 2003;63 (5): 463–92.
 153. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* 1987;8(1):1–28.
 154. Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, Lanz RB, Zoumpourlis VC, Schwartz RJ. Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J. Biol. Chem.* 2005;280 (9): 7786–92.

155. Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet.* 2008 Apr;40(4):437-42.
156. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008 May 3;371(9623):1505-12.
157. Yang TL, Chen XD, Guo Y, Lei SF, Wang JT, et al. Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet.* 2008 Dec;83(6):663-74. Epub 2008 Nov 6.
158. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2460-6.
159. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ i sur. 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.
160. Kaštelan D. Epidemiološke i genetske značajke metabolizma kosti u muškaraca. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2007.
161. Boot AM, de Ridder MA, Pols HA, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(1):57-62.
162. Yin J, Dwyer T, Riley M, Cochrane J. The association between maternal diet during pregnancy and bone mass of the children at age 16. *Eur J Clin Nutr.* 2010 In Press.
163. Jones G, Riley MD, Dwyer T. Maternal diet during pregnancy is associated with bone mineral density in children: a longitudinal study. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(10):749-56.
164. Kilpinen-Loisa P, Paasio T, Soiva M, Ritanen UM, Lautala P, Palmu P, Pihko H, Mäkitie O. Low bone mass in patients with motor disability: prevalence and risk factors in 59 Finnish children. *Dev Med Child Neurol.* 2010 In Press.
165. Johnson ML, Lara N, Kamel MA. How genomics has informed our understanding of the pathogenesis of osteoporosis. *Genome Med.* 2009;1(9):84.

166. Tse KY, Macias BR, Meyer RS, Hargens AR.J Heritability of bone density: regional and gender differences in monozygotic twins. *Orthop Res.* 2009;27(2):150-4.
167. Winzenberg TM, Shaw KA, Fryer J, Jones G. Calcium supplementation for improving bone mineral density in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006;2:eCD005119.

10. PRILOZI

10.1. PRILOG 1 - ANKETNI UPITNIK

Poštovani roditelji,

Pažljivo pročitajte dolje navedena pitanja, molim Vas za malo strpljenja i potpunu suradnju, rezultati neće utjecati na nikakve promjene u Vašem statusu ili u statusu Vaše djece.

Na osnovu svih rezultata vidjet će se da li treba nešto mijenjati u okviru školske prehrane, povećanja sati tjelesne aktivnosti ili nešto drugo. Rezultati Vaših anketa su povjerljivi i ne smiju se za ništa drugo upotrijebiti osim za provođenje ovog istraživanja.

ANKETNI UPITNIK o prehrani tjelesnoj aktivnosti Vaše djece

1. Pitanje DNEVNA KOLIČINA Kalcija u hrani izražava se u miligramima (mg). Za odgovor o unosu dnevne količine kalcija, dobit ćete popis namirnica bogatih kalcijem, vidjeti količinu na koju je izračunata količina kalcija, odrediti koliko puta se ta namirnica koristi dnevno i u kojoj količini, pogledati sve namirnice, zbrojiti predložene količine i izračunati dnevni unos kalcija u mg.
2. Da li vaše dijete konzumira gazirana pića: Fanta, Coca Cola, Sprite? Potrebno odrediti dnevnu količinu:
 1. do 2 dcl/dnevno
 2. od 2 do 6 dcl/d
 3. više od 6 dcl/d
 4. ne konzumira gazirano.
3. Da li je Vaše dijete fizički aktivno? Molim navesti sport koji trenira Vaše dijete najmanje godinu dana 3 x tjedno. (_____) .
 1. aktivno bavljenje nekim sportom najmanje godinu dana
 2. 2x tjedna srednja fizička aktivnost u trajanju 1-2 sata (trčanje, povremeni grupni sportovi, aerobik, gimnastika)

3. mala-minimalna tjelesna aktivnost: šetanje, spremanje kuće do maksimalno 2 sata tjedno.
4. Koliko sati Vaše dijete provodi vremena ispred TV dnevno?
 1. manje od 1 sat
 2. od 1 do 3 sata
 3. od 3 do 4 sata
 4. više od 4 sata
5. Koliko sati Vaše dijete provodi pred kompjuterom dnevno?
 1. manje od 1 sat
 2. od 1 do 3 sata
 3. od 3 do 4 sata
 4. više od 4 sata
6. Koliko sati Vaše dijete boravi dnevno vani tijekom ljeta:
 1. od 1 do 2 sata
 2. od 2 do 4 sata
 3. od 4 do 6 sati
 4. više od 6 sati
7. Koliko sati Vaše dijete boravi dnevno vani tijekom zime:
 1. manje od 1 sata
 2. od 1 do 2 sata
 3. od 2 do 4 sata
 4. više od 4 sata
8. Koliko sati Vaše dijete spava? Molim navesti apsolutnu vrijednost !

U prilogu tablica za preračunavanje dnevne količine kalcija unesene hranom u mg.

Unaprijed Zahvaljujem

Blaženka Miškić, dr. med.
spec. int. medicine

10.2. PRILOG 2 - OBAVIJEST ZA PRISTANAK ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Poštovani roditelji

Ovim putem Vam želimo pojasniti svrhu i cilj ovog ispitivanja, te osigurati Vaš dobrovoljni pristanak za sudjelovanje Vaše djece u njemu.

Tema istraživanja je:

Ovisnost ultrazvučnih parametara petne kosti u dječjoj dobi o genskim polimorfizmima

CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja je utvrditi utjecaj pojedinih genetskih čimbenika na maksimalnu koštanu masu koja se postiže od puberteta do trećeg desetljeća života i genetski je zadana. Niska koštana gustoća je jedan od glavnih uzroka osteoporoze u kasnijoj dobi.

Budući da su spolni hormoni, posebno estrogeni, te čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF-1) među najvažnijim regulatorima metabolizma kosti, primarni cilj ovog istraživanja je analizirati utjecaj gena za estrogeni receptor, gena za androgeni receptor, gena za IGF-1 i gena za aromatazu (enzim potreban za pretvorbu androgena u estrogen) na mineralnu koštanu gustoću (BMD) mjerenu kvantitativnim ultrazvukom u djevojčica i dječaka u dobi od 11 i 12 godina.

Sekundarni ciljevi istraživanja su:

1. ANALIZIRATI MEĐUOVISNOST uzv parametara petne kosti s antropometrijskim parametrima: TV, TT i BMI.
2. Analizirati međuovisnost uzv parametara petne kosti i fizičke aktivnosti, unosa mliječnih proizvoda, konzumiranja gaziranih pića.
3. Analizirati međuovisnost UZV parametara petne kosti i Tannerove klasifikacije sekundarnih spolnih oznaka.

4. Analizirati međuovisnost polimorfizma mikrosatelitnih regija gena za alfa estrogene receptor, gena za androgeni receptor, gena za IGF-1, gena za aromatazu i 25-OHD u serumu.

Trajanje

Svi učenici koji imaju pismenu suglasnost roditelja za uključanje u ispitivanje i vađenje krvi će pristupiti ispitivanju. Mjerenje težine, visine i pubertalnog stadija prema Tanneru će obaviti specijalisti školske medicine na dan UZV mjerenja petne kosti. Tada će biti izvršeno vađenje 30 ml krvi za genetske i biokemijske analize.

Određivanje koštanog statusa:

Svakom ispitaniku će biti učinjen kvantitativni uzv petne kosti (QUS) bezbolna pretraga koštane gustoće na petnoj kosti, aparatom Sahara (HOLOGIC). Bit će izmjerena brzina prolaska zvuka kroz kost (SOS) i slabljenje zvuka pri prolasku kroz kost (BUA) dok će ultrazvučni indeks (QUI) koji predstavlja kombinaciju prethodna dva parametra izračunati programskom podrškom aparata. Bit će određena i koštana mineralna gustoća (BMD) kod svakog ispitanika. Također će svakom ispitaniku biti uzeto 10 ml krvi za genetske analize (gen za estrogene receptor, gen za androgeni receptor, gen za IGF-1 i gen za aromatazu), 10 ml krvi za biokemijske pretrage te 10 ml krvi za analizu 25-OHD.

O istraživanju

Radi se o rutinskim analizama koje se primjenjuju u svakodnevnoj praksi.

Neželjeni učinci

Pri ovim pretragama nisu poznati neželjeni učinci.

Povjerljivost

Svi dokumenti vezani uz ovo ispitivanje bit će povjerljivi te će uvid u dokumentaciju imati samo Vaš liječnik i vi. Ime vašeg djeteta se neće objaviti u niti jednom izvještaju niti publikaciji proizašloj iz ovog ispitivanja.

Vaša prava

Ako tijekom ovog ispitivanja imate bilo koje pitanje u svezi ovog ispitivanja možete kontaktirati Blaženku Miškić, dr. med. na tel. broj: 091 542 7557.

Dobrovoljno sudjelovanje

Vaša odluka za sudjelovanje Vašeg djeteta u ovom ispitivanju dragovoljna je i odbijanje sudjelovanja neće za sobom povlačiti nikakve neugodnosti. Osim toga sudjelovanje možete prekinuti u bilo kojem trenutku bez ikakvih obaveza s vaše strane. Liječnik Vašeg djeteta ga ima pravo povući iz istraživanja ako iz bilo kojeg razloga to smatra potrebnim.

Pismeni pristanak

Pažljivo sam pročitao gore navedene podatke i shvatio sve navedeno. Na sva postavljena pitanja sam dobio zadovoljavajući odgovor. Također razumijem da je moguće napustiti istraživanje bilo koje vrijeme i bez neugodnosti i posljedica i obaveza s naše strane.

Pristajem da se mom djetetu izvrše sva antropometrijska mjerenja, određivanje pubertalnog statusa uzv mjerenje i vađenje krvi za genetske analize.

POTPIS ISPITANIKA (Roditelj za dijete)

POTPIS ISPITIVAČA:

Datum_____

Datum_____

10.3. PRILOG 3 - POJAŠNJENJE POSTUPAKA

Poštovani roditelji!

Nakon brojnih predavanja o značaju i podcijenjenosti osteoporoze, koje ste imali priliku slušati tijekom svih ovih godina, u Udruzi i na javnim tribinama, shvatilo se da je problem osteoporoze najbolje rješavati prevencijom.

Došlo se do spoznaja da je najbolja prevencija osteoporoze, postizanje visoke koštane mase u periodu puberteta, u doba kad je ubrzan koštani rast i razvoj.

Upravo zbog svega toga u dogovoru s ravnateljima Vaših osnovnih škola odlučili smo se za seriju predavanja o pravilnoj prehrani, potrebnom unosu kalcija i neophodnoj fizičkoj aktivnosti, u dječjoj dobi, koja je bitna za postizanje veće količine koštane mase tijekom puberteta.

S obzirom da postoji malo podataka kolika je normalna koštana gustoća u dječjoj dobi, a ne znamo, da li je u naše djece, viša ili niža, od naših europskih susjeda proveli bi ultrazvučno mjerenje koštane gustoće učenika 5 i 6 razreda: djece stare 11 i 12 godina.

Anketnim upitnicima koje ćete dobiti, odredili bi kakav im je način prehrane, koliko su tjelesno aktivni, izmjerili bi im visinu i težinu te odredili stadij puberteta po Tanneru. (ovo bi radili liječnici školske med. na dan mjerenja)

Svima onima za koje dobijemo suglasnost za određivanje genskih biljega za osteoporozu, bi izvadili 30ml krvi i poslali na genetske i biokemijske analize.

Svi roditelji će naknadno dobiti rezultate istraživanja i biti upućeni o ev. potrebnim postupcima za poboljšanje koštane gustoće.

U prilogu:

1. Objašnjenje i suglasnost za anketiranje o prehrani i fizičkoj aktivnosti.
2. Suglasnost za provođenje Uzv mjerenja koštane gustoće (određivanje TT, Tv stadija po Tanneru), suglasnost za vađenje 30 ml krvi za genske biljege, biokemiju, spolne hormone, vit D

3. Tablice za preračunavanje dnevne količine kalcija izražene u miligramima.

Nadam se da će te shvatiti značaj ovog istraživanja i omogućiti provođenje.

S poštovanjem

Blaženka Miškić, dr. med.
spec. int. med.

Predsjednica podružnice Društva za osteoporozu i predsjednica udruge „OSTEOR“
Sl. Brod

11. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 02. srpanj 1960., Slavonski Brod, Hrvatska

Adresa: Odjel za unutarnje bolesti, Opća bolnica «Dr. Josip Benčević», Slavonski Brod., Andrije Štampara 42.

Obrazovanje:

1974. godine završila osnovnu školu u Slavonskom Brodu.

1978. godine završila Gimnaziju „Zlatko Šnajder“ u Sl. Brodu.

1983. godine diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

1983. godine odradila obvezatni liječnički staž u Medicinskom centru Slavonski Brod.

1986. godine završila dvije obvezatne godine opće ambulante u Industrijskoj općoj ambulanti u Tvornici Đuro Đaković

1986. početak specijalističkog staža iz Interne medicine u Medicinskom centru u Slav. Brodu

1988. nastavak specijalizacije Interne medicine u KB „Sestre Milosrdnice“ u Zagrebu

1991. položila specijalistički ispit iz Interne medicine na KBC «Sestre Milosrdnice » u Zagrebu

2000. godine položila završni ispit na Poslijediplomskom studiju iz endokrinologije i dijabetologije na KB „Sestre Milosrdnice“ u Zagrebu

1987. završila edukaciju za UZV štitnjače sa ciljanom punkcijom u CZZM i bolesti štitnjače KB „Rebro,, u Zagrebu kod prim. H. Tomić i prim. Bence

2004. upisala poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

Zaposlenje:

Od 1983. godine u stalnom radnom odnosu u Medicinskom centru Slavonski Brod.

Od 1984. do 1986. nakon odrađene dvije godine obvezatne opće medicine u industrijskoj ambulanti u „Đuri Đakoviću“ u trajnom radnom odnosu u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Od 1986 do 1988. godine na specijalizaciji

iz Interne medicine na istom odjelu u Slavonskom Brodu. Od 1988. do 1991. na specijalizaciji iz Interne medicine na KBC „Sestre Milosrdnice“ u Zagrebu. Od 1986. bavi se uzv abdominalnih organa na Internom odjelu. Od 1987. uvodi UZV pretrage štitnjače sa ciljanom punkcijom. Od 1998. uvodi Uzv mjerenje koštane gustoće petne kosti i postaje rukovoditelj Centra za osteoporozu u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“. Od 2000. godine nabavkom rtg denzitometrije postajemo Regionalni centar tako da dalje radi kao rukovoditelj novoosnovanog Centra.

Organizacija znanstvenih i stručnih skupova

Član organizacionog odbora Kongresa za osteoporozu 2000. godine u Rovinju. Organizator stručnih sastanaka Društva za osteoporozu na regionalnom nivou u nekoliko navrata 2004., 2005., 2006. Član organizacijskog odbora Internističkih dana Zbora liječnika Hrvatske 1988. godine u Slavonskom Brodu.

Članstvo i funkcije u stručnim i znanstvenim društvima

Od 1983. član Hrvatskog liječničkog zbora. (HLZ)

Od 1990. član Endokrinološkog društva

Od 2001. član Hrvatskog društva za kalcificirana tkiva

Od 2001. član Društva za osteoporozu

Od 2002. član International Osteoporosis Foundation (IOF)

Od 2002. član European Calcified Tissue Society (ECTS)

Od 2002. član European Endocrinological Comitee (ECE)

Od 2004. član European Assosiation Study od Diabetes (EASD)

Ostala stručna djelatnost

Od 1987. godine radi uzv pretrage štitnjače sa ciljanom citološkom punkcijom na internom odjelu u Slav. Brodu Od tada radi i ultrazvučnu dijagnostiku u gastroenetrologiji i endokrinologiji. Kroz desetak godina održala svake godine jedno ili više predavanja na HLZ, Podružnica Slavonski Brod, te na brojnim stručnim sastancima u Hrvatskoj i izvan Hrvatske na teme iz područja endokorinologije, opće

interne medicine, osteoporoze, te dosta javnozdravstvenih predavanja po školama i javnim trbinama o preventivnim javnozdravstvenim problemima vezanim uz prehranu, osteoporozu, debljinu i hipertenziju. Aktivni istraživač u „MK -018“ studiji.

Uža područja znanstvenog i stručnog interesa

Osteoporoza

Bolesti štitnjače

Debljina

Šećerna bolest sa svim komplikacijama

Prehrana i ljudsko zdravlje

Organizacija zdravstva u provođenju preventivnih programa za očuvanje zdravlja i menadžment u zdravstvu.

Ostale društvene djelatnosti

Od 2000. do 2006. član Hrvatskog društva za Osteoporozu

Od 2003. član Upravnog odbora Ženskog košarkaškog kluba „Brod“

Od 2007. Predsjednik Udruge za prevenciju osteoporoze „Osteor“ u Slavonskom Brodu.