

# Sodobni pogled na nastanek osteoporoze

## Up-to-date insight on the development of osteoporosis

Simona Mencej Bedrač, Barbara Ostanek, Vid Mlakar, Janja Zupan, Tomaž Kocjan, Janez Preželj, Janja Marc

**Povzetek:** Ključna problema pri osteoporozi sta njena razširjenost in pozna diagnostika. Predvidevajo, da se bo število obolelih do leta 2050 podvojilo. Novejša dognanja kažejo, da razvoj osteoporoze poteka preko motenj v dveh glavnih regulatornih sistemih. Prvi, ki ga imenujemo RANKL/RANK/OPG, je ključen za nadzor osteoklastogeneze, drugi pa je signalna pot Wnt, ki ima osrednjo vlogo v osteoblastogenezi. Obstajajo dokazi, da so v patogenezo osteoporoze vpleteni tudi oksidativni stres, imunski sistem, vnetni citokini in procesi adipogeneze. Na razvoj osteoporoze vplivajo številni okoljski in genetski dejavniki. Na večino od njih nimamo vpliva, lahko pa z uravnoteženo prehrano z zadostno količino kalcija in vitamina D, redno telesno aktivnostjo, zdravim načinom življenja brez kajenja in čezmernega pitja alkoholnih pijač, pomembno zmanjšamo pojav bolezni.

**Ključne besede:** estrogen, RANKL/RANK/OPG, Wnt, vnetje, adipocit

**Abstract:** Two major problems related to osteoporosis are its high incidence and late diagnosis. It is predicted that the number of affected individuals will double till 2050. Recent findings have shown that osteoporosis develops as a consequence of imbalance in two key regulatory systems. RANKL/RANK/OPG system represents a crucial pathway involved in osteoclastogenesis, while Wnt signalling pathway plays a central role in osteoblastogenesis. In the recent years, numerous studies have shown the involvement of oxidative stress, immune system and inflammatory cytokines as well as adipogenesis in the pathogenesis of osteoporosis. The development of osteoporosis is influenced by several environmental and genetic factors. Many of them cannot be modified, but the incidence of osteoporosis can be markedly reduced by proper diet with sufficient amounts of calcium and vitamin D, regular physical activity and healthy lifestyle with no smoking and excessive use of alcohol.

**Keywords:** estrogen, RANKL/RANK/OPG, Wnt, inflammation, adipocyte

## 1 Osteoporoza - definicija in načini za diagnostiko in spremljanje

### 1.1 Definicija osteoporoze

Osteoporoza je s starostjo povezana degenerativna bolezen skeleta in predstavlja enega večjih zdravstvenih problemov, saj zaradi podaljševanja življenjske dobe število obolelih hitro narašča. Pri starosti 50 let je danes tveganje, da ženska bele rase do konca življenja utrpí osteoporozni zlom kolka, vretenca ali zapestja 40 – 53 %, pri moških pa je to tveganje 13 – 22 % (1-4). Predvidevajo, da se bo število osteoporoznih zlomov do leta 2050 več kot podvojilo (5). Za osteoporozo je značilna močno povečana lomljivost kosti, predvsem vretenc, kolka in zapestja, tako da do zlomov pride že ob vsakodnevnih obremenitvah (6). Vzrok za to so znižana kostna masa in spremembe v mikroarhitekturi kostnine. Zlom kolka je brez dvoma najresnejši zaplet osteoporoze z do

30 % smrtnostjo v prvem letu po zlomu (7). Verjetnost za zlom kolka pri 50-letni osebi bele rase je 14 % za žensko in 5 - 6 % za moškega (8). Kriteriji Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) za diagnozo osteoporoze so navedeni v **preglednici 1** (9, 10).

**Preglednica 1:** Opredelitev osteoporoze po merilih Svetovne zdravstvene organizacije (9, 10).

**Table 1:** Definition of osteoporosis according to World Health Organization criteria (9, 10).

Definicija	Mineralna kostna gostota
Normalna kost	$T \geq -1 \text{ SD}$
Osteopenija	$-2,5 \text{ SD} < T < -1 \text{ SD}$
Osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD}$
Huda osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD}$ in zlom

\* T: opredeljena kot razlika med izmerjeno in pričakovano MKG pri zdravi osebi v zgodnji odrasli dobi, deljeno s SD v populaciji; SD: standardna deviacija glede na najvišjo MKG mlade, zdrave odrasle osebe.

asist. dr. Simona Mencej Bedrač, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

asist. dr. Vid Mlakar, univ. dipl. mikrobiol., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

asist. dr. Janja Zupan, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

doc. dr. Tomaž Kocjan, dr. med., spec. internist, Univerzitetni klinični center, Klinika za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

prof. dr. Janez Preželj, dr. med., spec. internist, Univerzitetni klinični center, Klinika za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

Ali ste vedeli,

- da po 35. letu starosti zdrave ženske do menopavze vsako leto izgubijo do 3 % kostne mase, osteoporozne bolnice pa med 5 – 7 %;
- da je tveganje za osteoporozni zloma kolka, vretenc ali zapestij enkrat do konca življenja pri 50 let stari ženski bele rase 40 – 53 %;
- da je zaradi osteoporoznega zloma kolka smrtnost v prvem letu po zlomu do 30 %.

## 1.2 Diagnostika osteoporoze

### 1.2.1 Slikovne metode v diagnostiki osteoporoze

Mineralna kostna gostota (MKG), ki jo lahko izmerimo z metodo dvoenergijske rentgenske absorpcionometrije (DXA, angl. dual-energy x-ray absorptiometry), močno korelira z lomljivostjo kosti v biomehanskih testih, v prospektivnih raziskavah pa predstavlja najpomembnejši posamični dejavnik tveganja za zlom pred prvim zlomom in pričetkom zdravljenja. Tveganje za zlom z nižanjem MKG eksponentno narašča (11). Ravno na osnovi teh podatkov je delovna skupina SZO zaključila, da je mogoče postaviti diagnozo in začeti z zdravljenjem osteoporoze že pred prvim zlomom, torej le na osnovi znižane MKG (9). Merjenje MKG z DXA je še vedno metoda izbora za postavitev diagnoze osteoporoze pred prvim zlomom. Primera meritev MKG vretenc in kolka z DXA pri bolnici z osteoporozo sta predstavljena na **sliki 1**.

Ker več kot polovica bolnikov, ki utрпи osteoporozni zlom, nima osteoporoze po kriterijih SZO, nas v klinični praksi danes bolj zanima bolnikovo tveganje za zlom, kot pa sama diagnoza osteoporoze na podlagi meritve MKG (12).

### 1.2.2 Biokemijski kazalci v krvi pri spremljanju zdravljenja osteoporoze

Z metodo DXA lahko tudi spremljamo zdravljenje osteoporoze, čeprav spremembe MKG zaznamo šele po enem letu zdravljenja ali kasneje. Na

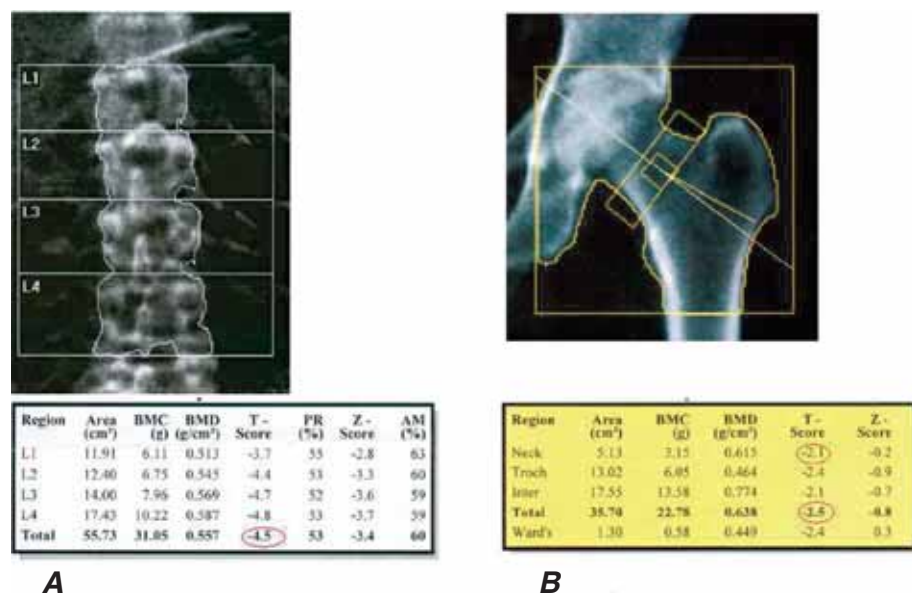
srečo se serumski biokemijski kazalci spremenijo pri uspešni terapiji že v treh do šestih mesecih po uvedbi zdravljenja. V ta namen sta strokovni združenji IOF/IFCC leta 2010 izdali priporočilo, da se kot referenčna označevalca za gradnjo oziroma razgradnjo kosti v krvi določata N-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PINP) oz. C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX) (13). Uspešno zdravljenje z anti-resorptivom mora znižati vrednost CTX za vsaj 25%, teriparatid pa zvišati PINP za vsaj 25% glede na začetno meritev (14).

### 1.2.3 Orodje za izračun tveganja za osteoporozni zlom

V zadnjem času se je razširila uporaba novega orodja za izračun tveganja za osteoporozni zlom FRAX (angl. Fracture Risk Assessment Tool), kjer za napovedovanje 10-letnega tveganja za klinični zlom vretenca, podlahti, kolka ali nadlahtnice pri pomenopavznih ženskah in moških po 50. letu poleg meritve MKG lahko upoštevamo še druge od MKG neodvisne dejavnike tveganja za zlom, kot so starost, spol, telesna masa in višina, predhodni zlomi pri preiskovancu, zlom kolka pri starših, kajenje in pretirano uživanje alkohola, kronično zdravljenje z glukokortikoidi, prisotnost revmatoidnega artritisa in drugih vzrokov za sekundarno osteoporozo (15, 16, 17). Na **sliki 2** je predstavljen primer izračuna 10-letnega tveganja za štiri glavne osteoporozne zlome in posebej za zlom kolka.

Ali ste vedeli:

- da s slikanjem z DXA izmerimo MKG in omogočimo diagnostiko osteoporoze že pred prvim zlomom;
- da so za oceno in spremljanje zdravljenja bolj uporabne krvne preiskave (CTX, PINP);
- da z uporabo programa FRAX lahko napovemo tveganje za osteoporozne zlome.



**Slika 1:** Meritev mineralne kostne gostote (MKG) ledvenih vretenc (A) in kolka (B) z DXA pri bolnici z osteoporozo. Na področju ledvenih vretenc upoštevamo MKG vretenc L1-L4 (A), pri kolku pa MKG celotnega kolka in MKG vratu stegenice (B). Diagnostično pomembne vrednosti T so označene z rdečo, interpretiramo pa jih v skladu s preglednico 1.

**Figure 1:** Measurement of bone mineral density (BMD) of lumbar spine (A) and hip (B) in osteoporotic patient with DXA. We should consider BMD of L1-L4 (A) and of total hip and femoral neck. Diagnostically important T-scores are encircled with red and should be interpreted according to Table 1.



**Slika 2:** Izračun 10-letne verjetnosti za štiri glavne osteoporozne zlome, ki je pri tej bolnici 17 %, in za osteoporozni zlom kolka, ki je 1,5 %. Orodje FRAX je prosto dostopno na povezavi <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>. Ker kvalitetni epidemiološki podatki za Slovenijo niso na voljo, za izračun tveganja za osteoporozni zlom uporabljamo verzijo FRAX za Veliko Britanijo.

**Figure 2:** The calculation of 10-year probability for 4 major osteoporotic fractures and hip fracture for a female patient gives the probability of 17% and 1.5%, respectively. FRAX Calculation Tool is freely available at <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>. As high quality epidemiological data for Slovenia are not available, United Kingdom version of FRAX is used for the osteoporotic fracture probability calculation.

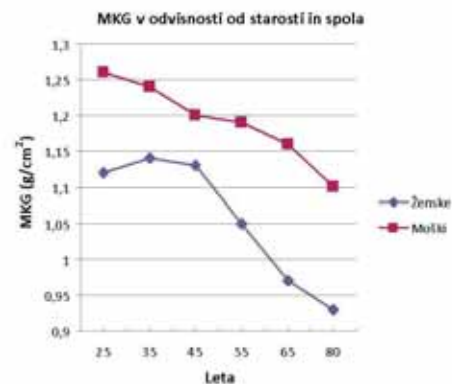
## 2 Kostna prenova

V kostnem tkivu vse življenje poteka dokaj intenziven biokemijski proces kostne preнове ali kostne remodelacije, v katerem se staro kostno tkivo zamenjuje z novim, da se ohranjajo določene lastnosti npr. prožnost kosti. V procesu kostne preнове se kostnina najprej razgradi, takoj nato pa nadomesti z enako količino novo sintetizirane kostnine. Razmerje med razgradnjo (resorpcijo) kostnine in gradnjo (formacijo) kostnine se tekom življenja fiziološko spreminja: v otroški dobi je gradnja večja od razgradnje kostnine, v obdobju med 25. in 35. letom starosti sta oba procesa v ravnovesju, po 35. letu pa vstopimo v obdobje upadanja kostne mase, kjer je razgradnja bolj intenzivna kot gradnja nove kostnine (**slika 3**). Vsako leto naj bi se zamenjalo 5 do 10 % kostnine, kar pomeni, da obnova celotnega skeleta traja vsaj 10 let (10).

V procesu kostne preнове sta ključni dve vrsti celic: osteoklasti, ki so odgovorni za razgradnjo kosti, in osteoblasti, ki gradijo kostnino. Obe celični vrsti sta medsebojno povezani v tako imenovano kostno remodelacijsko enoto. Enota vsebuje še centralno žilno kapilaro in je oživčena. Ugotovili so, da naj bi bilo v določenem trenutku aktivnih cca. 35 milijonov kostnih remodelacijskih enot, torej mest na kostnih površinah, kjer se vrši kostna prenova, ki poteka v več fazah (**slika 4**):

A. mirovanje in aktivacija – neaktivni ploščati osteoblasti (>lining cells<>) pokrivajo kostnino in se ob ustreznem stimulusu razmaknejo, tako da se izpostavi kostna površina;

- B. privabljanje osteoklastov in razgradnja (resorpcija) kostnine – razgaljena kost kemotaktično privabi osteoklaste, osteoklasti se prilepijo na kostno površino in začnejo razgrajevati kost, kar lahko traja do 12 dni;
- C. preobrat in privabljanje osteoblastov– osteoklasti se odmaknejo iz erozijske lakune, v njo pa se naselijo mononuklearni fagociti, ki očistijo nastalo lakuno in izgradijo cementno plast, kemoatraktanti privabijo osteoblaste, ki se diferencirajo in aktivirajo;
- D. sinteza kostnega matriksa in mineralizacija - osteoblasti sintetizirajo kolagen in druge proteine novega osteoida, kar traja od 1 do 2 tednov; po sintezi osteoida se prične mineralizacija, pri kateri sodelujeta encima alkalna fosfataza in osteokalcin. V tej fazi se osteoblasti sploščijo in pride do primarne mineralizacije, kar lahko traja do 3 mesece. Del osteoblastov ostane ujet v kostnem matriksu in se pretvori v osteocite.

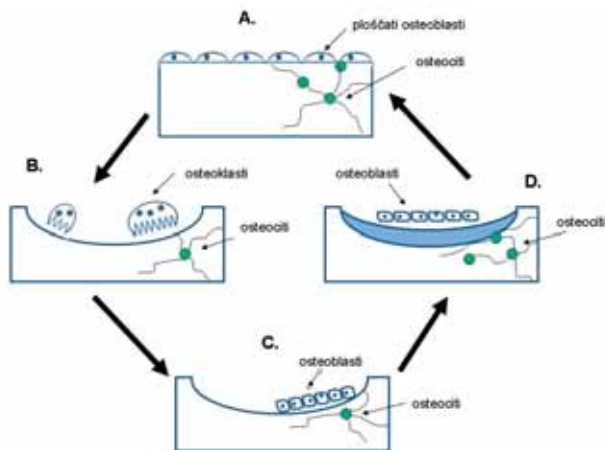


**Slika 3:** Mineralna kostna gostota (MKG) v odvisnosti od starosti in spola. Vidimo, da moški dosežejo maksimalno MKG do 30. leta nato pa se jim MKG linearno zmanjšuje. Ženske po drugi strani dosežejo maksimalno MKG do 35. leta, nato pa se jim MKG linearno zmanjšuje do menopavze, ko začne pospešeno upadati, padanje pa se po 5 letih v menopavzi zmanjša. Podatki hkrati kažejo, da imajo moški v povprečju večjo MKG kot ženske (18).

**Figure 3:** Bone mineral density (BMD) is dependent on age and gender. Men reach peak BMD at the age of 30 and after that their BMD decreases linearly. Women reach their peak BMD at the age of 35, after that their BMD decreases at the same rate till menopause. After the menopause, BMD starts to decline rapidly and slows down after 5 years. In general, men have higher BMD than women (18).

Uravnavanje intenzivnosti celotnega procesa kostne preнове poteka na več nivojih preko uravnavanja aktivnosti in števila osteoblastov in osteoklastov. Uravnava se lahko lokalno ali sistemsko. Sistemski regulatorji so hormoni (kalcitriol, rastni hormoni, paratiroidni hormon (PTH), kortikosteroidi, ščitnični hormoni in spolni hormoni). V lokalno regulacijo pa so vpleteni citokini, rastni in diferenciacijski dejavniki, kot sta osteoprotegerin (OPG) in ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa B$  (RANKL) (19-21). Prav na tem nivoju so novejšje študije pokazale, da pomembno vlogo pri uravnavanju procesa kostne preнове igrajo osteociti, ki izvirajo iz osteoblastov, ujetih v kostnem tkivu.

Pokazano je bilo, da osteociti odločilno vplivajo na nivoje signalne molekule RANKL. Ta je nujno potrebna za dozorevanje osteoklastov, ki nato razgrajujejo kosti. Raziskave hkrati kažejo, da so osteociti odzivni tudi na PTH, ki naj bi moduliral osteocitno izražanje prej omenjenega diferenciacijskega dejavnika RANKL. Vse to postavlja osteocite v vlogo osrednjih regulatorjev, ki določajo število kostnih remodelacijskih enot in uravnavajo hitrost kostne razgradnje in gradnje znotraj le-teh (22). Ti dejavniki so pomembni za pravilno delovanje in sestavo kostne remodelacijske enote ter s tem za sklopitev procesov razgradnje in gradnje kostnine.



**Slika 4:** Proces kostne preнове, ki vključuje 4 stopnje: mirovanje in aktivacija (A), razgradnja kostnine (B), preobrat in privabljanje osteoblastov (C) ter gradnjo kostnine in mineralizacijo (D).

**Figure 4:** Bone remodelling process enclodes 4 stages: quiescence and activation (A), bone resorption (B), reversal and recruitment of osteoblasts (C), and bone formation and mineralization (D).

### 3 Uravnavanje procesa kostne preнове

Poznavanje mehanizmov, ki delujejo sistemsko ali na lokalnem nivoju ter uravnavajo delovanje kostnih celic in posledično celoten proces kostne preнове, je za farmacevte pomembno. Predstavlja namreč osnovo za iskanje novih terapevtskih prijemališč in na ta način usmerja razvoj zdravil za zdravljenje osteoporoze. V nadaljevanju bodo predstavljena predvsem najnovejša dognanja na področju patofizioloških mehanizmov razvoja osteoporoze.

#### 3.1 Vloga estrogenov in reaktivnih kisikovih spojin v kostnem tkivu

Že zelo dolgo je znano, da estrogeni močno vplivajo na kostno preново, saj po eni strani zavirajo kostno razgradnjo in po drugi strani pospešujejo delovanje osteoblastov. Svoje učinke posredujejo preko vezave na estrogenska receptorja (ER) dveh tipov,  $\alpha$  in  $\beta$ , ki sta produkta dveh različnih genov. V organizmu imata ER $\alpha$  in ER $\beta$  podobno, vendar ne identično tkivno porazdelitev, njuna natančna vloga v različnih tkivih pa je predmet intenzivnih raziskav, ki kažejo, da imata receptorja različni in nezamenljivi vlogi. Izražanje nekaterih genov uravnava oba bodisi

sinergistično bodisi antagonistično, medtem ko je uravnavanje izražanja nekaterih genov posledica učinka le preko enega od obeh tipov receptorjev (23, 24). V kosteh se oba izražata v vseh treh vrstah kostnih celic in tako posredujeja učinke estrogenov, vendar naj bi bili za učinke estrogenov v kosteh bolj pomembni ER $\alpha$  (24, 25).

Kot vsi steroidni hormoni, delujejo tudi estrogeni na dva načina. Poleg »klasičnega« genomskega, poznamo tudi pri estrogenih t.i. nengenomski način. Pri genomskem delovanju se estrogeni po vezavi na svoj receptor v citoplazmi v tem kompleksu premaknejo v jedro, kjer kompleks deluje kot transkripcijski dejavnik, torej uravnava izražanje svojih tarčnih genov npr. OPG, alkalne fosfataze, katepsina K in na tartrat rezistentne kisle fosfataze (26). Uravnavanje je lahko neposredno preko vezave kompleksa estrogeni-ER na zaporedja DNA v teh genih, ki se imenujejo »na estrogene odzivni elementi«. Pri genih, ki teh zaporedij nimajo, pa je vpliv na transkripcijo posreden, preko interakcije kompleksa z različnimi transkripcijskimi dejavniki, ki se nato vežejo na svoja vezavna mesta na DNA. Danes vemo, da je ravno aktivacija tarčnih genov, odgovornih za proliferacijo celic na opisan način, glavni mehanizem kancerogeneze pri nekaterih vrstah hormonsko odzivnih rakavih obolenj npr. določenem tipu raka dojke. Pri nengenomskem načinu delovanja estrogenov gre za hitre učinke, ki so pogosto povezani z aktivacijo različnih protein-kinaznih kaskad. Zanje so najverjetneje odgovorni ER, ki se nahajajo na celični membrani in ne v citoplazmi (23).

Glavni učinki estrogenov na kosti so:

- zaviranje nastanka novih kostnih remodelacijskih enot, najverjetneje preko zmanjšane apoptoze osteocitov. Natančen mehanizem ni poznan, študije pa kažejo na pomen interakcije med estrogeni in signalno potjo Wnt;
- zmanjševanje kostne razgradnje. Estrogeni zavirajo diferenciacijo in pospešujejo apoptozo osteoklastov. To dosežejo preko signalne poti OPG/RANKL/RANK in preko zmanjšanja sinteze TNF $\alpha$  in ostalih proresorptivnih citokinov (opisano v poglavjih 3.2 in 3.5). Pomembno vlogo pri posredovanju učinkov estrogenov imajo verjetno tudi limfociti T;
- vzdrževanje gradnje kosti. Estrogeni usmerjajo mezenhimske matične celice v razvoj osteoblastov na račun adipocitov, spodbujajo diferenciacijo in preprečujejo apoptozo osteoblastov (opisano v poglavju 3.6) (27, 28).

Po enotnem modelu patofiziologije osteoporoze iz leta 1998 naj bi pomanjkanje estrogenov predstavljalo najpomembnejši vzrok za razvoj osteoporoze pri pomenopavznih ženskah in tudi za zmanjševanje kostne mase pri starejših moških. Novejše raziskave, pri katerih so s pomočjo kvantitativne računalniške tomografije ločeno opazovali spremembe kortikalne in trabekularne kostnine, pa so pokazale, da to drži predvsem za kortikalno kostnino. Kortikalna ali kompaktna kostnina je razporejena laminarno v tesnih koncentričnih plasteh na zunanjem obodu posameznih kosti in zajema preko 80 % celotne mase kostnine. Sredico posameznih kosti, npr. dolgih kosti pa tudi vretenc in kolka pa sestavlja »spužvasta« ali trabekularna kostnina (slika 5). Zaradi velike specifične površine trabekularne kostnine je kostna prenova tukaj mnogo bolj intenzivna in zato se motnje v tem procesu na tem delu kostnega tkiva mnogo bolj izrazijo kot v kortikalnem delu kostnega tkiva. Vendar pa novi podatki dokazujejo, da je kortikalna kostnina glavna determinanta kostne trdnosti in odpornosti proti zlomu. Vse kaže, da je kvaliteta in kvantiteta kortikalne kostnine bolj povezana z zlomi kot trabekularna kostnina.



Slika 5: Zgradba kosti – kortikalna in trabekularna kostnina (29).

Figure 5: Structure of bone – cortical and trabecular bone (29).

Zato so se začele raziskave na področju osteoporoze usmerjati v proučevanje biokemijskih procesov tudi v kortikalni kosti. Zelo kmalu so ugotovili so, da začetek upada kortikalne kostnine sovпада z nastopom menopavze pri ženskah. Nasprotno pa se upad trabekularne kostnine prične že v tretji dekadi življenja, ko so koncentracije estrogenov še visoke. Vsekakor pa se njen upad po nastopu menopavze pospeši. To kaže, da je izguba velikega dela trabekularne kostnine bodisi neodvisna od estrogenov, oziroma da so za njeno ohranitev potrebne bistveno višje koncentracije estrogenov od fizioloških. Ena izmed možnih razlag za različen vpliv estrogenov na kortikalno in trabekularno kostnino je v tem, da osteoblasti in osteociti v kortikalni kosti izražajo predvsem ER $\alpha$ , v trabekularni pa poleg ER $\alpha$  tudi signifikanten delež ER $\beta$ . Tako bi lahko bili heterodimeri ER $\alpha$ / $\beta$  v trabekularni kostnini odgovorni za njeno manjšo občutljivost na estrogene (28, 30).

Pred skoraj 20 leti so prvič prospektivno preučevali vpliv staranja na zlome neodvisno od MKG in ugotovili, da je pri enaki MKG tveganje za zlom pri 20 let starejši osebi kar 4-krat večje (31). Res je, da se s starostjo zmanjšujejo mnoge telesne funkcije (npr. nevro-muskularna funkcija), ki vplivajo na pogostost zlomov, vendar se s starostjo spreminja tudi samo kostno tkivo. Pokazali so, da se s starostjo v kosteh kopičijo reaktivne kisikove spojine, kar vodi v aktivacijo osteoklastogeneze in povečanje apoptoze osteoblastov. Na ta način lahko pojasnimo izgubljanje kostne mase že pred menopavzo. Zmanjšanje koncentracije estrogenov (in tudi androgenov pri moških) po menopavzi še poveča izgubljanje kostnine, saj imajo estrogeni in androgeni tudi antioksidativne lastnosti in pred menopavzo ščitijo kost pred oksidativnim stresom (32).

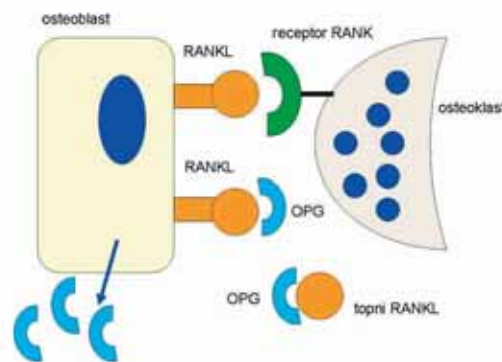
Ali ste vedeli,

- da se z menopavzo zaradi pomanjkanja estrogenov močno zmanjša kortikalna kostnina, medtem ko se upad trabekularne kostnine prične že v tretji dekadi življenja, ko so koncentracije estrogenov še visoke in se v menopavzi le pospeši;
- da je izgubljanje kostne mase tudi posledica staranja in kopičenja reaktivnih kisikovih spojin v kostnem tkivu.

### 3.2 Sistem RANKL/RANK/OPG

Dolga leta nazaj so bili prepričani, da so glavne celice, ki uravnavajo kostno premeno, osteoklasti. Dokazovali so, da je sinteza nove kostnine z osteoblasti določena z intenzivnostjo osteoklastne razgradnje kosti, saj

je glavna naloga osteoblastov zapolnitev celotnega volumna erozijske lakune z na novo sintetiziranim matriksom. Z odkritjem regulatornega sistema RANKL/RANK/OPG pa je postalo jasno, da je delovanje osteoklastov pod nadzorom osteoblastov. Osteoblasti namreč izločajo ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANKL; angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) in osteoprotegerin (OPG). RANKL se veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANK; angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) na membrani osteoklastov ter povečata število in aktivnost osteoklastov (33). OPG je topni receptor za RANKL in z RANK tekmuje za vezavo na RANKL ter tako inhibira delovanje RANKL (34, 35). Na ta način osteoblasti, ki so sicer odgovorni za sintezo novega kostnega matriksa, uravnavajo tudi kostno razgradnjo, kar jih postavlja v središče regulacije celotne kostne preнове (slika 6).



Slika 6: Sistem RANKL/RANK/OPG.

RANKL: ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B;  
RANK: receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B;  
OPG: osteoprotegerin.

Figure 6: RANKL/RANK/OPG system.

RANKL: receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand;  
RANK: receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B; OPG: osteoprotegerin.

RANKL je poleg makrofagnega kolonije stimulirajočega dejavnika (M-CSF) nujen dejavnik za razvoj osteoklastov iz hematopoetskih matičnih celic, iz katerih se v kostnem mozgu razvijejo mononuklearne celice monocitno-makrofagne linije. Te najverjetneje po mehanizmu kemotakse prehajajo na mesta razgradnje kostnine, kjer se vežejo na kostni matriks in se pod vplivom RANKL in M-CSF diferencirajo do večjedrnih zrelih osteoklastov (36, 37).

V človeškem telesu se RANKL nahaja kot transmembranski protein ali kot topna oblika proteina (38). RANKL nima pomembne vloge samo pri diferenciaciji osteoklastov, pač pa je tudi modulator delovanja in preživetja osteoklastov (39-42). Sistem RANKL/RANK/OPG sodeluje predvsem pri uravnavanju nastajanja in delovanja osteoklastov, pri preživetju in aktivaciji dendritičnih celic, aktivaciji celic T, razvoju limfatičnega sistema in mlečnih žlez, diferenciaciji celic B ter pri termoregulaciji pri ženskah in zvišanju telesne temperature pri vnetju (43).

Kmalu po odkritju sistema RANKL/RANK/OPG so v njem prepoznali obetavne tarče za razvoj novih, predvsem bioloških zdravil, saj se je pri miših brez genov za RANK ali RANKL razvila osteopetroza zaradi popolne odsotnosti osteoklastov (44-46). Poleg tega se je pri miših brez gena za OPG že zgodaj razvila osteoporoza zaradi povečane

diferenciacije osteoklastov (34). Ker je sistem RANKL/RANK/OPG ključen v procesu osteoklastogeneze, bi lahko z delovanjem na ta sistem vplivali tudi na razvoj osteoporoze.

Ali ste vedeli,

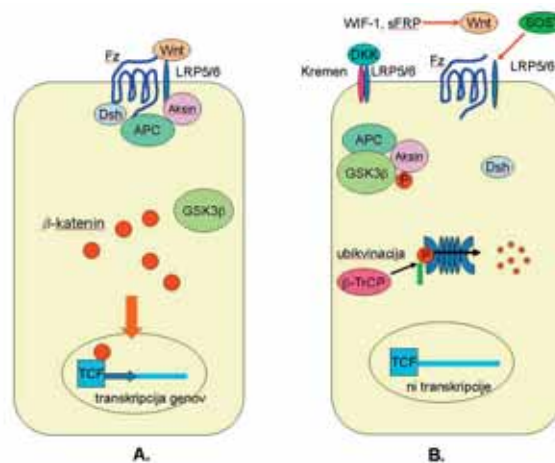
- da je sistem RANKL/RANK/OPG glavni regulator nastajanja in delovanja osteoklastov in s tem tudi kostne razgradnje;
- da je prvo biološko zdravilo na področju zdravljenja osteoporoze denosumab protitelo proti RANKL;
- da osteoblasti izločajo RANKL in OPG ter tako nadzorujejo osteoklaste.

### 3.3 Vloga signalne poti Wnt in serotonina

Z razvojem učinkovitih postopkov kultiviranja osteoblastov in po ugotovitvi njihove osrednje vloge v kostni prenovi so se raziskave na osteoblastih zelo razširile. Raziskovalci so preučevali pglavlitne regulatorne sisteme, vpletene v nastajanje in aktivnost osteoblastov, ter skušali odkriti ključne molekule pri uravnavanju kostne tvorbe. Kmalu so ugotovili, da ima pri tem pomembno vlogo signalna pot Wnt (47). Kostna masa se po aktivaciji signalne poti Wnt povečuje preko različnih mehanizmov npr. preko indukcije osteoblastogeneze, povečanja proliferacije in preživetja preosteoblastov in nezrelih osteoblastov ter preko inhibicije apoptoze osteoblastov in osteocitov (47). Na **sliki 7** je shematsko predstavljena signalna pot Wnt.

Pokazali so tudi, da signalna pot Wnt negativno vpliva na nastajanje osteoklastov.  $\beta$ -katenin se namreč veže na transkripcijske dejavnike TCF/LEF1 v jedru, ti pa povečajo izražanje gena za OPG. Nastali OPG se veže na RANKL in tako zavira osteoklastogenezo (49, 50).

Nedavno so znanstveniki prišli do presenetljivega odkritja o vlogi serotonina pri uravnavanju kostne mase. Raziskave na tem področju so se začele, ko so dokazali izražanje serotoninskih receptorjev na membrani osteoblastov ter negativen vpliv serotonina na gradnjo kosti. Rezultati raziskav nakazujejo, da LRP5 (angl. low-density lipoprotein receptor-related protein 5), ki je pomemben igralec v signalni poti Wnt, preko še neznanega mehanizma inhibira triptofan hidrolazo 1, ki je vpletena v nastajanje serotonina iz triptofana. Serotonin, ki nastaja v enterokromafinih celicah dvanajstnika in se sprošča v krvi obtok, se veže na receptor Htr1b na površini osteoblastov, kar povzroči zmanjšano izražanje Creb in ciklina ter zmanjšano proliferacijo osteoblastov in gradnjo kosti (51). Po drugi strani pa serotonin, ki nastaja v osrednjem živčnem sistemu in ne prehaja krvno-možganske bariere, prav tako vpliva na kostnino. Dokazali so namreč, da serotonin v možganih lahko inhibira sintezo adrenalina in zmanjša tonus simpatika, kar zmanjša signalizacijo preko adrenergičnih receptorjev  $\beta_2$ , ki so prav tako na površini osteoblastov. Opisani mehanizem vodi do povečanja proliferacije osteoblastov in gradnje kosti ter do zmanjšanja kostne razgradnje preko zmanjšanja sinteze RANKL (52). Raziskave trenutno kažejo, da si periferni in centralni učinki serotonina na kostno tkivo nasprotujejo, saj serotonin iz črevesja zmanjšuje kostno tvorbo, medtem ko serotonin v možganih preko zaviranja simpatika povečuje gradnjo kosti in zmanjšuje njeno razgradnjo.



**Slika 7:** Signalna pot Wnt. A. Signalna pot Wnt se aktivira z vezavo proteina Wnt na receptorski kompleks LRP 5/6 (angl. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) in proteina Fz (angl. Frizzled), kar v celici vodi do fosforilacije citoplazemskega dela LRP 5/6 in nastanka vezavnega mesta za aksin. Na aksin se vežeta še APC (angl. adenomatous polyposis coli) in Dsh (angl. Disheveled), kar onemogoči nastanek kompleksa APC/aksin/GSK3 $\beta$  (angl. glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ). Na ta način je inhibirana aktivnosti GSK3 $\beta$  ter njena sposobnost fosforilacije  $\beta$ -katenina, kar vodi do njegovega kopičenja v citoplazmi.  $\beta$ -katenin zato prehaja v jedro, kjer preko veže na transkripcijske dejavnike TCF/LEF1 sproži izražanje tarčnih genov, večjo proliferacijo osteoblastov in tvorbo kostnine (44). B. Signalno pot Wnt lahko inhibiramo na 3 načine: 1) z dejavnikoma WIF-1 (angl. Wnt inhibitory factor) in sFRP (angl. secreted frizzled-related protein), ki se vežeta neposredno na Wnt in preprečita njegovo vezavo na LRP 5/6 in Fz; 2) preko proteina Dickkopf 1 (DKK1), ki poveže LRP 5/6 in receptor Kremen, kar vodi do endocitoze tega kompleksa; ter 3) preko sklerostina (SOST), ki se veže na LRP5/6 in prepreči aktivacijo z Wnt (48).

**Figure 7:** Wnt signaling pathway. A. Wnt signaling pathway is activated by Wnt binding to its receptors LRP 5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) and Fz (Frizzled), leading to phosphorylation of the cytoplasmic tail of LRP 5/6 and formation of docking site for axin. APC (adenomatous polyposis coli) and Dsh (Disheveled) form a complex with axin, thus preventing the formation of APC/axin/GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) complex. The GSK3 $\beta$  activity and its capability of phosphorylation is inhibited leading to the accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm.  $\beta$ -catenin enters the nucleus, binds to TCF/LEF1 transcription factors and triggers the expression of target genes, leading to the increased osteoblast proliferation and bone formation (44). B. Wnt signaling pathway could be inhibited: 1) by WIF-1 (Wnt inhibitory factor) and sFRP (secreted frizzled-related protein), binding to Wnt and prevent Wnt binding to LRP 5/6 and Fz; 2) by DKK1 (Dickkopf 1) that recruits LRP 5/6 and Kremen into complexes, the complexes are internalized; and 3) by SOST (sclerostin) that binds to LRP5/6 and prevents the activation with Wnt (48).

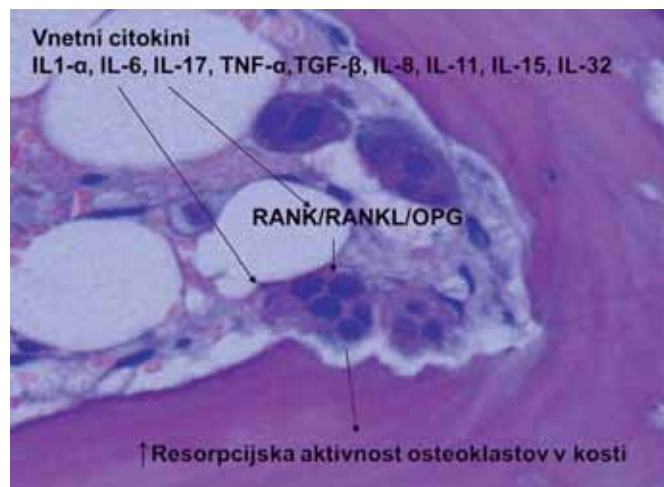
**Ali ste vedeli,**

- da je signalna pot Wnt glavni regulator nastajanja in delovanja osteoblastov, to je celic, ki gradijo kostnino;
- da je signalna pot Wnt pomembna tudi v procesu kancerogeneze različnih tumorjev npr. na debelem črevesju, itd.;
- da že poteka razvoj drugega biološkega zdravila, ki je protitelo proti SOST.

**3.5 Vloga vnetja pri nastanku osteoporoze**

Povezava med vnetjem kot nespecifičnim imunskim odzivom in izgubo kostnine je bila že dolgo znana pri revmatoidnem artritisu (RA) in zdravljenju z glukokortikoidi (53). Zanimivo je, da so se pred kratkim začeli pojavljati tudi dokazi o vlogi vnetja in vnetnih citokinov v patogenezi kostnih bolezni, ki tradicionalno niso veljale za vnetne bolezni, kot je npr. osteoporoza (54-56). S starostjo povezane spremembe v koncentraciji in izražanju vnetnih mediatorjev naj bi imele vpliv na izgubo kostne mase pri starejših. Osteoimunologija je relativno mlada veda o kompleksnih interakcijah med kostnimi in imunskimi celicami, ki se dogajajo v kostnem mikrookolju preko skupnih molekul, kot so citokini, kemokini, rastni in transkripcijski dejavniki ter signalne molekule. Termin osteoimunologija se je prvič pojavil leta 2000 (57), njeni začetki pa segajo že v leto 1972, ko je Horton s sodelavci v supernatantu stimuliranih humanih levkocitov odkril nov dejavnik, ki je bil sposoben kostne razgradnje *in vitro* (58). V fizioloških pogojih je aktivnost osteoklastov natančno uravnana z delovanjem sistemskih in lokalnih dejavnikov. V patoloških stanjih, ki privedejo do pretirane aktivacije imunskega sistema in sproščanja vnetnih citokinov, pa se njihova aktivnost iztiri (59). Na grobo lahko vnetne citokine razdelimo na osteoklastogene, ki stimulirajo osteoklaste, in anti-osteoklastogene, za katere so bili dokazani nasprotni, zaviralni učinki na osteoklaste. Po trenutnih dokazih uvrščamo vnetne citokine, kot so IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17 in TNF- $\alpha$ , med osteoklastogene (**slika 8**), medtem ko imajo IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- $\gamma$  in IFN- $\beta$  dokaze o anti-osteoklastogenem delovanju (60). Dokazi na področju prepletenosti kostnega in imunskega sistema z intenzivnim razvojem osteoimunologije naraščajo (61-63) in posegajo tudi v razlago patogeneze pomenopavzne osteoporoze. Ker endokrinološka razlaga ne razloži patogeneze osteoporoze v celoti, osteoimunologija predlaga odgovor v vplivu aktiviranih limfocitov T in vnetnih citokinov, kot so TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-7 in IFN- $\gamma$  na pospešeno kostno razgradnjo po menopavzi (64, 65). Pomenopavzne osteoporozne ženske imajo zvišane tako sistemske (66-68) kot tudi lokalne koncentracije IL-1, TNF- $\alpha$  in IL-6 v kostnem mozgu (69). Kostne celice pomenopavznih žensk brez terapije izražajo večje količine IL-1, TNF $\alpha$  in IL-6 kot kostne celice žensk na estrogenski nadomestni terapiji (68). Pokazali so tudi, da serumske vrednosti IL-6 prispevajo do 34 % k celokupni variabilnosti v MKG v prvih letih po menopavzi (71). Inhibicija TNF- $\alpha$  in IL-1 je zmanjšala kostno razgradnjo pri pomenopavznih osteoporoznih ženskah (72). Pomenopavzne osteoporozne ženske imajo tudi večjo aktivnost limfocitov T kot njihove zdrave vrstnice. Limfociti T naj bi prispevali k zvečani osteoklastogenezi na dva načina: 1) z zvečanim sproščanjem TNF- $\alpha$  in RANKL, in 2) z zvečanjem števila osteoklastnih predhodnikov (73). Pri bolnikih z osteoporoznim zlomom so dokazali zvečano izražanje genov za IL-1 $\alpha$ , IL-6, RANKL/OPG in zmanjšano izražanje IFN- $\gamma$  (73, 74). Kanadska multicentrična študija je dokazala, da imajo pomenopavzne ženske, ki

se zdravijo z COX-2 inhibitorji in niso zdravljenje z estrogeni, zvišano MKG (75).



**Slika 8:** Vpliv osteoklastogenih vnetnih citokinov na zvečano aktivnost osteoklastov v kostnem tkivu.

**Figure 8:** The influence of the osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines on enhanced activity of the osteoclasts in bone tissue.

**Ali ste vedeli,**

- da osteoimunologija raziskuje povezavo med celicami imunskega in kostnega sistema ter pomaga pri razlagi vnetne komponente kostnih bolezni, kot je osteoporoza.

**3.6 Vloga adipogeneze pri razvoju osteoporoze**

Popolnoma nove so tudi raziskave na področju učinkov adipogeneze t.j. nastajanja maščobnih celic v kostnem mozgu in njihove vpletenosti v patogenezo osteoporoze. Adipogeneza je vzbudila zanimanje zaradi dejstva, da s staranjem začnejo adipociti nadomeščati osteoblaste. Zanimivo je, da je ta proces bolj izrazit pri bolnikih z osteoporozo (76, 77). Te ugotovitve navajajo na sklep, da bi osteoporoza lahko bila povezana s procesom adipogeneze. Temu v prid govori dejstvo, da se adipociti in osteoblasti razvijejo iz skupne (mezenhimske) matične celice. Receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) je ključni dejavnik, ki usmerja diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic v adipocitno vrsto in mišji modeli so v raziskavah po aplikaciji rosiglitazona (agonist PPAR $\gamma$ ) pokazali zmanjšano kostno gostoto (78). Ugotovili so tudi, da dolgotrajno zdravljenje bolnic z diabetesom tipa 2 z agonisti PPAR $\gamma$  poveča tveganje za zlome (76, 79).

**4 Dejavniki tveganja in preventiva osteoporoze**

Osteoporoza je kronična sistemska bolezen okostja, ki se pojavi s starostjo. Za kronične bolezni je značilno, da potekajo počasi in dolgotrajno, ko pa bolezen odkrijemo, so organi oz. tkiva že močno in

običajno ireverzibilno okvarjeni. Zato je pri kroničnih boleznih izjemno pomembna zgodnja diagnostika, predvsem pa uspešna preventiva. Obe sta odvisni od prepoznavanja dejavnikov tveganja za razvoj bolezni pri posamezniku. Dejavnike tveganja za razvoj osteoporoze in osteoporozni zlom lahko razdelimo na genetske (80) in negenetske, slednje pa lahko razdelimo na tiste, na katere sami lahko vplivamo, in na tiste, na katere nimamo vpliva (**Preglednica 2**).

**Preglednica 2:** Dejavniki tveganja za osteoporozni zlom (81).

**Table 2:** Risk factors for osteoporotic fracture (81).

Dejavniki, na katere nimamo vpliva	Dejavniki, na katere lahko vplivamo
Zenski spol	Nizek indeks telesne mase
Starost	Kajenje
Zgodnja menopavza	Prekomerno uživanje alkohola
Bela rasa	Fizična neaktivnost
Družinska anamneza osteoporoze	Nezadosten vnos kalcija in vitamina D

Največ lahko za preventivo osteoporoze naredimo v starosti do 30. leta z uravnoteženo prehrano (vsaj 1000 mg kalcija in 800 enot vitamina D dnevno), redno telesno aktivnostjo in splošnim zdravim načinom življenja brez kajenja in čezmernega pitja alkoholnih pijač. Pozneje so najbolj ogroženi posamezniki s predhodnim osteoporoznim zlomom, ki je definiran kot nizkoenergetski zlom, kar pomeni npr. zlom kolka zaradi padca s stojne višine (82). Tak zlom kolka ali vretenca že zadošča za diagnozo osteoporoze, ki jo je potrebno zdraviti. Leta 2012 smo dobili nacionalna priporočila za zdravljenje zloma kolka (7). Takoj po zlomu moramo pri teh bolnikih (če serumski kalcij ni zvišan) zapolniti zaloge vitamina D z 2000 enot (50 ug) holecalfiferola dnevno ali 14.000 enot tedensko, po mesecu dni pa naj bolnik nadaljuje zdravljenje s polovičnim odmerkom. Če kalcij ni povišan, pa morajo ti bolniki zaužiti še 1200 mg kalcija na dan. Osteoporoza je tako značilen dejavnik tveganja za nizkoenergetski zlom, vendar je potrebno razlikovati med dejavniki, ki vplivajo na presnovo kosti, in dejavniki tveganja za zlom (kvaliteta vida, nagnjenost k padcem, mišična moč itd.) (83). Sekundarni vzroki za osteoporozo so dokazani za naslednja klinična stanja: anoreksija nervosa, kronična jetrna bolezen, celiakija, hiperparatiroidizem, vnetna črevesna bolezen, hipogonadizem, ledvična bolezen, revmatoidni artritis, dolgotrajno jemanje glukokortikoidov, pomanjkanje vitamina D. Pri teh stanjih se lahko osteoporoza pojavi kot dodaten zaplet in jo je prav tako potrebno zdraviti oz. preprečevati.

Slovenski bolniki z osteoporozo so organizirani v regionalnih društvih, ki so povezana v Zvezo društev bolnikov z osteoporozo, v okviru katere so izdali tudi publikacijo, ki pomaga bolnikom z informacijami o sami bolezni ter z nasveti o zdravem življenjskem slogu (predvsem gibanju in prehrani) (84).

Ali ste vedeli,

- da je osteoporoza pomemben dejavnik tveganja za nizkoenergetski zlom;
- med dejavniki tveganja ločimo tiste, ki vplivajo na presnovo kosti, in dejavniki tveganja za zlom, kot so kvaliteta vida, nagnjenost k padcem, mišična moč itd.

## 4.1 Genetska nagnjenost k osteoporozi

Raziskave na enojajčnih in dvojajčnih dvojčkih ter družinah z osteoporozo so dokazale močan genetski vpliv na razvoj osteoporoze. V zadnjih skoraj 20 letih so raziskovalci tudi na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo intenzivno iskali gene in/ali mutacije, ki bi lahko bile odgovorne za dedno nagnjenost k osteoporozi. Študije so pokazale, da je v patogenezo osteoporoze najverjetneje vpleteno večje število genov s posamično majhnim učinkom, ki pa interagirajo med seboj in z dejavniki okolja (85, 86). Najobsežnejšo raziskavo na področju iskanja genetskih dejavnikov tveganja za osteoporozo je opravil konzorcij GEFOS v sodelovanju s konzorcijem GENOMOS. Analizirali so celoten genom 32.000 posameznikov nato pa kandidatne gene in mutacije potrjevali na skupini 130.000 vzorcev DNA. V to raziskavo je bila vključena tudi Slovenija z raziskovalci iz Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. V tem 3-letnem projektu, ki ga je financirala EU, so odkrili povezanost z MKG za gene, ki kodirajo molekule iz signalne poti RANK-RANKL-OPG, Wnt in diferenciacije mezenhimskih matičnic celic ter endohondralne osifikacije (86).

Trenutno iščejo kombinacije genov oz. sprememb, ki bi lahko identificirale posameznike s povečanim genetskim tveganjem za osteoporozo. Raziskave pa se nadaljujejo in usmerjajo na mehanizme izražanja osteoporoznih genov na nivoju RNA in histonov (epigenetika).

Ali ste vedeli,

- da genetsko nagnjenost k osteoporozi oblikuje večje število genov, katerih posamični vplivi pa so majhni;
- da danes še vedno iščemo kombinacijo genskih sprememb, s katero bi lahko identificirali osebo s povečanim tveganjem za razvoj osteoporoze;
- da dejavniki okolja lahko interagirajo z genetskimi spremembami, tako da lahko nekatere tvegane genotipe »prekrijemo« s primerno prehrano in gibanjem.

## 5 Sklep

- metoda izbora za postavitev diagnoze osteoporoze pred prvim zlomom je DXA, za spremljanje zdravljenja pa se poleg DXA uporabljajo tudi biokemijski označevalci kostne preнове (PINP, CTX);
- za napoved tveganja za osteoporozni zlom poleg DXA in biokemijskih označevalcev kostne premene uporabljamo tudi novo orodje FRAX;
- pomanjkanje estrogenov je najpomembnejši vzrok za razvoj osteoporoze pri pomenopavznih ženskah in pri starejših moških. Izgubljanje kortikalne kostnine sovпада z nastopom menopavze pri ženskah, upadanje trabekularne kostnine pa se prične že v tretji dekadi življenja;
- sistem RANKL/RANK/OPG je ključen v procesu osteoklastogeneze, signalna pot Wnt pa v osteoblastogenezi;
- razvoj osteoporoze je povezan tudi z oksidativnim stresom, vnetjem in adipogenezo;
- dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze so okoljski in genetski, vendar na nekatere od njih lahko vplivamo (telesna masa, kajenje, uživanje alkohola, telesna aktivnost, prehrana s kalcijem in vitaminom D), na



nekatero pa ne (spol, starost, zgodnja menopavza, rasa, družinska anamneza).

## 6 Literatura

- Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C et al. Perspective: how many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1005–1010.
- van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG et al. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone* 2001; 29: 517–522.
- Kanis JA, Johnell O, Oden A et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporos Int* 2000; 11: 669–674.
- Doherty DA, Sanders KM, Kotowicz MA et al. Lifetime and five-year age-specific risks of first and subsequent osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2001; 12: 16–23.
- Bleibler F, Konnopka A, Benzinger P, et al. The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany—a demographic simulation model. *Osteoporos Int* 2012, Jul 14.
- Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002; 359: 1929–1936.
- Komadina R, Senekovič V, Dolenc I et al. Priporočila za zdravljenje zloma kolka v Sloveniji *Zdrav Vestn* 2012; 81: 183–92.
- Paksima N, Koval KJ, Aharanoff G et al. Predictors of mortality after hip fracture: a 10-year prospective study. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66(2): 111–117.
- World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843: 1–129.
- World Health Organisation. Prevention and management of osteoporosis. *WHO Tech Report Series* 2003; 921:1–192.
- Blake GM, Fogelman I. The clinical role of dual energy X-ray absorptiometry. *Eur J Radiol* 2009; 71: 406–414.
- Siris ES, Boonen S, Mitchell PJ et al. What's in a name? What constitutes the clinical diagnosis of osteoporosis? *Osteoporos Int* 2012; 23: 2093–2097.
- Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O et al; for the IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22: 391–420.
- Diez-Perez A, Adachi JD, Agnusdei D et al; for the IOF CSA Inadequate Responders Working Group. Treatment failure in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012 Jul 27.
- Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane JM. The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92: 743–53.
- University of Sheffield. WHO Fracture Risk Assessment Tool. <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>. Dostop: 12-09-2012.
- McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Kanis JA. From relative risk to absolute fracture risk calculation: the FRAX algorithm. *Curr Osteoporos Rep* 2009; 7 (3): 77–83.
- Warming L, Hassager C, Christiansen C. Changes in bone mineral density with age in men and women: a longitudinal study. *Osteoporos Int* 2002; 13: 105–112.
- Kocjančič A. Presnovne bolezni kosti. V: Kocjančič A in Mrevlje F: *Interna medicina* 1998; 711–736.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2000; 21 (2): 115–137.
- Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *American Journal of Medicine* 2000; 108: 153–164.
- Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2012; 27 (3): 499–505.
- Heldring N, Pike A, Andersson S et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87 (3): 905–931.
- Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: Estrogen receptor - mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1703–1714.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23 (3): 279–302.
- Krum SA. Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone. *J Cell Biochem* 2011; 112: 401–408.
- Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1068: 173–179.
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 2011; 377 (9773): 1276–1287.
- Biology of bone. In: Bartl R, Frisch B. *Osteoporosis: diagnosis, prevention, therapy*. Springer-Verlag, 2009: 9.
- Riggs BL, Melton LJ, Robb RA et al. A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J Bone Miner Res* 2008; 23 (2): 205–214.
- Hui SL, Slemenda CW, Johnston Jr CC. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* 1988; 81: 1804–1809.
- Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010; 31 (3): 266–300.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175–179.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260–1268.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309–319.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342.
- Ross, FP; Teitelbaum, SL. *Osteoclast Biology*. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Kelsey, J., editors. *Osteoporosis*. 2nd Edition ed.. San Diego: Academic Press; 2001. p. 73–106.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79: 243–253.
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145: 527–538.
- Fuller K, Wong B, Fox S et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998; 188: 997–1001.
- Lum L, Wong BR, Josien R et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999; 274: 13613–13618.
- Wong BR, Besser D, Kim N et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Molecular Cell* 1999; 4: 1041–1049.
- Jules J, Ashley JW, Feng X. Targeting of RANK signaling pathways as new therapeutic strategies for osteoporosis. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14 (9): 923–934.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315–323.
- Dougall WC, Glaccum M, Charrier K et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13: 2412–2424.
- Li J, Sarosi I, Yan X-Q et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1566–1571.
- Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 1202–1209.
- Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone disease. *Gene* 2004; 341: 19–39.
- Glass DA, Bialek P, Ahn JD et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005; 8: 751–764.
- Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem* 2005; 280 (22): 21162–21168.
- Vadav VK, Ryu JH, Suda N et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008; 135: 825–837.
- Yadav VK, Oury N, Suda ZW et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009; 138: 976–989.
- Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008; 118 (11): 3537–3545.
- Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 2007; 65 (12 Pt 2): S147–151.

55. Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wien Med Wochenschr* 2010; 160 (17-18): 438-445.
56. Lencel P, Magne D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses* 2011; 76 (3): 317-321.
57. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408 (6812): 535-536.
58. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA et al. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* 1972; 177 (51): 793-795.
59. Gao Y, Grassi F, Ryan MR et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest* 2007; 117 (1): 122-132.
60. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275 (3): 768-775.
61. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008; 29(4): 403-440.
62. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol* 2009; 29 (5): 555-567.
63. Takayanagi H. The unexpected link between osteoclasts and the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2010; 658: 61-68.
64. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992; 257 (5066): 88-91.
65. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol* 2008; 252 (1-2): 68-80.
66. Pacifici R, Brown C, Puscheck E et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 (12): 5134-5138.
67. Pfeilschifter JR, Köditz, Pfohl M et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002; 23 (1): 90-119.
68. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen regulation of immune cell bone interactions. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1068: 256-274.
69. Pino AM, Rios S, Astudillo P et al. Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 2010; 25 (3): 492-498.
70. Ralston SH, Russell RG, Gowen M. Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1990; 5 (9): 983-988.
71. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (5): 2032-2042.
72. Charatcharoenwithaya N, Khosla S, Atkinson EJ et al. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (5): 724-729.
73. D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. *Bone* 2008; 43 (1): 92-100.
74. Richards JB, Joseph L, Schwartzman K et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone mineral density: results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 2006; 17 (9): 1410-1419.
75. Zupan J, Komadina R, Marc J. The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. *J Biomed Sci* 2012; 19: 28.
76. Dragojevič J. Adipogeneza in lipotoksičnost v kostnem tkivu. Doktorsko delo 2012. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana.
77. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, et al. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Exp Mol Med* 2007; 39 (6): 696-704.
78. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260 (1): 122-126.
79. Li GH, Kung AW, Huang QY. Common variants in FLNB/CRTAP, not ARHGEF3 at 3p, are associated with osteoporosis in southern Chinese women. *Osteoporos Int* 2010; 21 (6): 1009-1020.
80. Nguyen TV, Eisman JA. Genetics and the individualized prediction of fracture. *Curr Osteoporos Rep* 2012; 10 (3): 236-244.
81. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Guideline no. 71: Management of osteoporosis. <http://www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/71/section2.html>. Dostop: 23-10-2012.
82. Nelson HD, Morris CD, Kraemer DF et al. Osteoporosis in postmenopausal women: diagnosis and monitoring. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2001; 28: 1-2.
83. NIH. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South Med J* 2001; 94 (6): 569-573.
84. Kocjan T, Pfeifer M, Kozlevčar-Živec M et al. Vse kar moram vedeti o osteoporozi. 2. predelana in razširjena izd. Ljubljana: Zveza društev bolnikov z osteoporozo Slovenije, 2008. 63 str.
85. Xu XH, Dong SS, Guo Y et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev* 2010; 31 (4): 447-505.
86. Estrada K, Strykarsdottir U, Evangelou E et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012; 44 (5): 491-501.