Generacja reaktywnych form tlenu u kobiet pomenopauzalnych z osteoporozą

Reactive oxygen species generation in women with osteoporosis

Tomasz Stetkiewicz[1], Marcin Makowski[1], Grzegorz Stachowiak[1], Ireneusz Połać[1], Grzegorz Surkont[2], Tomasz Pertyński[1]

[1]Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi,
kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński
[2]Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;
kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

Przegląd Menopauzalny 2007; 4: 239–243

Streszczenie

Wpływ wolnych rodników na procesy utraty masy kostnej wydaje się być znaczący dla zrozumienia tych mechanizmów. Szczególnie istotne jest to w przypadku kobiet w okresie menopauzy, kiedy to nakładają się dwa zjawiska stymulujące powstawanie wolnych rodników – po pierwsze niedobór estrogenów, po drugie zaś wynikający z wieku spadek poziomu substancji o znaczeniu antyoksydacyjnym.

Cel pracy: Porównanie generacji reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej u kobiet w wieku pomenopauzalnym z osteoporozą, osteopenią i normalną gęstością masy kostnej.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 76 pacjentek w wieku pomenopauzalnym. Na podstawie badań densytometrycznych wyodrębniono 3 grupy pacjentek: grupę I (n=22) – kobiety z prawidłową gęstością tkanki kostnej (ang. *bone mass density* – BMD), grupę II (n=28) – kobiety z osteopenią oraz grupę III (n=26) – kobiety z osteoporozą. W wyróżnionych grupach kobiet porównywano generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, ocenianą na podstawie pomiaru chemiluminescencji (CL) w czasie tzw. wybuchu tlenowego tych komórek.

Wyniki: Wartości pól pod krzywymi emisji oraz wartości maksymalne chemiluminescencji spontanicznej (BS) neutrofili spoczynkowych i po stymulacji fMLP, PMA oraz zymosanem nie wykazywały różnic istotnych statystycznie w porównaniu grup kobiet z osteoporozą, osteopenią i prawidłowymi wartościami gęstości masy kostnej.

Wnioski: Generacja reaktywnych form tlenu przez neutrofile we krwi kobiet po menopauzie z osteoporozą i osteopenią nie wykazuje istotnych różnic w porównaniu z parametrami tego zjawiska u pacjentek z prawidłową tkanką kostną.

Słowa kluczowe: osteoporoza, osteopenia, reaktywne formy tlenu

Summary

Reactive oxygen species generation seems to be one of the important factors in osteoporosis pathogenesis.

Aim of study: Comparison of reactive oxygen species (ROS) generation by neutrophils of peripheral blood in postmenopausal women with osteoporosis, osteopenia and normal bone mass density (BMD).

Material and methods: 76 postmenopausal women were included in the study. Based on spinal densitometry three groups of women were selected: group I with normal BMD (n=22), group II with osteopenia (n=28) and group III with osteoporosis (n=26). Reactive oxygen species generation by neutrophils of peripheral blood was evaluated using chemiluminescence measurement.

Results: Areas under curves and maximal energy values of spontaneous chemiluminescence and stimulated neutrophils show no differences between the mentioned groups.

Conclusions: ROS generation by neutrophils in blood of postmenopausal women with osteoporosis and osteopenia do not differ from parameters of this phenomenon in patients with normal BMD.

Key words: osteoporosis, osteopenia, reactive oxygen species

Adres do korespondencji:
dr med. **Tomasz Stetkiewicz**, Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

Wstęp

Osteoporoza stanowi nie tylko problem leczniczy i rehabilitacyjny, ale też ekonomiczny. Dane epidemiologiczne z wielu krajów wskazują na wzrastającą liczbę złamań spowodowanych osteoporozą – zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Częściowo można to tłumaczyć zwiększającym się na świecie odsetkiem ludzi starszych, powyżej 65. roku życia. Według obowiązującej definicji osteoporoza jest układową chorobą szkieletu, cechującą się niską masą kostną, upośledzoną mikroarchitekturą tkanki kostnej, a w konsekwencji zwiększoną jej łamliwością i podatnością na złamania. Prowadzi do ścieńczenia i spadku liczby beleczek w kości gąbczastej oraz zmniejszenia grubości kości korowej. Utrata dotyczy pewnej objętości tkanki kostnej; u kobiet zmniejszenie gęstości kości beleczkowej wynosi w ciągu życia 15–50%, a kości litej 15–30%.

Wskaźnik utraty masy kostnej u kobiet jest najwyższy właśnie we wczesnym okresie po menopauzie. Typowy dla okresu pomenopauzalnego ubytek kości zależy przede wszystkim od dużej aktywności osteoklastów. Wywiera on szczególnie negatywny wpływ na mechaniczną wytrzymałość kości – dochodzi do zwiększenia się liczby głębokich jam resorpcyjnych i przerwania ciągłości beleczek kostnych, co powoduje wzrost wrażliwości na złamania. Jest to proces nieodwracalny, prowadzący do osłabienia funkcji podporowej szkieletu. W osteoporozie pomenopauzalnej stosunkowo najszybciej proces ten pojawia się w trzonach kręgowych. W tym miejscu należy podkreślić, że leki stosowane w terapii osteoporozy mogą zwiększyć grubość istniejących beleczek, ale nie są w stanie odtworzyć zniszczonej architektury kości gąbczastej. U kobiet z osteoporozą pomenopauzalną mogą pojawić się także, niekiedy nawet jednocześnie, zaburzenia w syntezie witaminy D związane z wiekiem, czyli II typ osteoporozy (osteoporoza starcza). Mniejsza szczytowa masa kostna u kobiet i szybszy jej zanik po menopauzie tłumaczy częstsze i wcześniejsze występowanie osteoporozy tzw. pierwotnej u kobiet niż u mężczyzn.

Rozwój osteoporozy determinuje wielkość szczytowej masy kostnej oraz związany z wiekiem i stanem hormonalnym stopień jej zaniku. Szczytową masę kostną osiąga się w okresie wzrostu i dojrzewania. Na jej wielkość duży wpływ mają czynniki genetyczne, takie jak polimorfizm genów dla receptora witaminy D, osteokalcyny, kolagenu typu I, estradiolu i cytokin [1, 2]. Równie istotny jest wpływ środowiska, długotrwałe unieruchomienie i styl życia oraz nawyki dietetyczne. Na przyśpieszenie osteoporozy, w sytuacji, gdy ulegnie zachwianiu równowaga między aktywnością czynników kościotwórczych na korzyść czynników stymulujących resorpcję, może wpływać również wiele czynników miejscowych i systemowych.

Do najważniejszych czynników wpływających na kościotworzenie należą u kobiet:
- kalcytonina,
- estrogeny,
- hormon wzrostu,
- insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I),
- androgeny, interferon γ (INF-γ).

Natomiast czynniki wpływające na resorpcję to:
- parathormon (PTH),
- witamina D_3,
- kortykosteroidy,
- interleukiny 1 i 6 (IL-1, IL-6),
- czynnik martwicy guza α (TNF-α),
- wolne rodniki tlenowe [3].

Osteoporoza pomenopauzalna zaliczana jest do osteoporozy pierwotnej inwolucyjnej, stanowiąc aż ok. 80% przypadków choroby. Jest rezultatem spadku stężenia estrogenów z powodu wygaśnięcia czynności jajników. Estrogeny odgrywają podstawową rolę w utrzymaniu masy kostnej i stabilizują obrót kostny, doprowadzając do hamowania aktywności resorpcyjnej osteoklastów oraz aktywności kościotwórczej osteoblastów. Osteoblasty wstrzymują sekrecję cytokin (IL-1, IL-6, TNF-α), stanowiących parakrynne stymulatory metabolizmu osteoklastów.

Cytokiny, produkowane m.in. w mikrośrodowisku kości, są niezbędne do różnicowania i prawidłowej aktywności osteoklastów. Interleukina 6 łączy się z receptorem powierzchniowym osteoklastów, stymulując ich aktywność. To działanie tłumaczy udokumentowaną już zależność podwyższonego stężenia IL-6 z osteoporozą. Czynnik martwicy guza α prawdopodobnie pobudza resorpcję kości za pośrednictwem IL-6. Wiadomo, że stężenia obu cytokin wzrastają u kobiet po menopauzie, natomiast estrogeny hamują ich produkcję. Wewnątrzkomórkowe czynniki odpowiedzialne za różnicowanie się osteoklastów, takie jak NF-B (*nuclear factor* B) są wrażliwe na reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS). Komórkami odpowiedzialnymi za resorpcję kości są osteoklasty. Ich liczba (poprzez zwiększone formowanie oraz blokowanie apoptozy) oraz aktywność wzrastają w warunkach deficytu estrogenów. W najnowszych badaniach oceniających wpływ estrogenów na regulację osteoklastów donosi się o trzech nowych członkach rodziny TNF [4]. Jednym z nich jest efektor różnicowania się osteoklastów, określany jako RANKL (ang. *receptor activator of nuclear factor* NF-κB *ligand*). Jest on ligandem aktywującym receptor dla NF-κB, występującym na linii zrębowych osteoblastów. W przypadku połączenia tych komórek z komórkami linii osteoklastów dochodzi do połączenia RANKL z jego fizjologicznym receptorem RANK (ang. *receptor activator of nuclear factor* NF-κB), który kontroluje wszystkie aspekty funkcjonowania osteoklastów. Zrębowe osteoblasty produkują osteoprotegerynę (OPG), która ma zdolność neutralizacji RANKL. Wiadomo, że pod wpły-

wem estrogenów dochodzi do wzrostu OPG oraz do spadku stężeń zarówno czynnika stymulującego kolonie makrofagów (M-CSF), biorącego udział w różnicowaniu osteoklastów, jak i RANK [5–7]. Część z tych działań odbywa się pośrednio poprzez pochodne estrogenów. Interleukina 1 oraz TNF-α podnoszą poziom RANKL, OPG, a także M-CSF [8, 9]. Ostatnio pojawiły się doniesienia o tym, że niedobór estrogenów prowadzący do nadmiernej resorpcji kości przez osteoklasty może być spowodowany obniżeniem obrony antyoksydacyjnej w komórkach osteoklastycznych. NF-B pozostaje w korelacji z ROS, które są dla tego czynnika elementem aktywującym, natomiast estrogeny oraz antyoksydanty mają działanie supresyjne. Produkcja rodnika ponadtlenkowego przez osteoklasty resorbujące tę tkankę może być miernikiem ich aktywności. Wiadomo również, że wolne rodniki inaktywują tlenek azotu, który z kolei ma zdolność hamowania aktywności osteoklastów. Wydaje się więc, że stosowanie estrogenów w ramach terapii hormonalnej, dzięki ich działaniu antyoksydacyjnemu, ma istotne znaczenie w hamowaniu procesu resorpcji kości kobiet w okresie menopauzy.

Cel pracy

Porównanie generacji reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej u kobiet w wieku pomenopauzalnym z osteoporozą, osteopenią i normalną gęstością masy kostnej.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 76 pacjentek w wieku pomenopauzalnym, leczonych w Poradni Kliniki Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi. Kryteriami wykluczającymi były występowanie ostrych lub przewlekłych chorób zapalnych, cukrzycy, stosowanie leków o właściwościach antyoksydacyjnych i HT przez ostatnie 6 mies. U wszystkich pacjentek wykonano badanie densytometryczne kręgosłupa. Pomiaru gęstości masy kostnej dokonywano za pomocą densytometru Lunar z zastosowaniem metody DEXA (ang. *dual-energy X-ray absorptiometry*). Gęstość masy kostnej mierzona była w odcinku lędźwiowym. Brano pod uwagę odcinek L1-L4 (L1L4) i pojedynczy kręg o najniższej ze wszystkich BMD (Lx). Wyniki wyrażone były w odniesieniu do referencyjnej populacji i podane w % (L1-L4%, Lx%) i w odchyleniach standardowych (L1-L4Z, Lx Z). Jako kryteria rozpoznania osteopenii i osteoporozy przyjmowano następujące wartości wymienionych parametrów BMD:

- osteoporoza – BMD <–2,5 SD,
- osteopenia – BMD pomiędzy –1 SD i –2,5 SD,
- norma – BMD pomiędzy –1 SD do +1 SD.

Na podstawie badań densytometrycznych wyodrębniono 3 grupy pacjentek – grupę I (n=22) – kobiety z prawidłowym BMD, grupę II (n=28) – kobiety z ostreopenią oraz grupę III (n=26) – kobiety z osteoporozą.

We wszystkich grupach kobiet porównywano generację reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej pacjentek, ocenianą na podstawie pomiaru chemiluminescencji (CL) w czasie tzw. wybuchu tlenowego tych komórek. Do wywołania wybuchu tlenowego neutrofili zastosowano następujące stymulatory – formylo-metionylo-leucylofenyloalaninę (fMLP), octan mirystynianu forbolu (PMA) i zymosan firmy Sigma-Aldrich. Jako wzmacniacza chemiluminescencji bezpośredniej użyto luminolu (Sigma-Aldrich). Płyn PBS (fizjologiczny roztwór NaCl zbuforowany fosforanami) wyprodukowała firma Biomed.

Pomiaru chemiluminescencji dokonywano przy użyciu aparatu LUMINOMETR 1251 (Pharmacia LKB). Badania przeprowadzano w stałej temperaturze 37°C±0,1. Luminometr w ciągu 30 min dokonywał 15 pomiarów. Każdą serię pomiarów wykonywano na 4 próbkach krwi powtarzając ją 2-krotnie. Na podstawie wyników pomiarów obliczano parametry chemiluminescencji:

- pole powierzchni pod krzywą emisji w funkcji czasu liczoną w ciągu 30 min, wyrażające całkowitą wartość energii wyemitowaną przez komórki w czasie pomiaru,
- maksimum krzywej emisji.

Oceniano chemiluminescencję spontaniczną (BS) neutrofili i stymulowaną fMLP, PMA oraz zymosanem. Próbki, w których oceniano wybuch tlenowy neutrofili spoczynkowych zawierały: 20 µl krwi pełnej, 20 µl luminolu, 20 µl PBS (BS), lub 20 µl fMLP (2×10^{-6} M/ ml), lub 20 µl PMA (2×10^{-8}M/ml) lub 30 µl zymosanu (10 mg/ml), PBS do łącznej objętości 1000 µl.

Do oceny istotności wartości parametrów chemiluminescencji w badanych grupach pacjentek użyto metody analizy wariancji dla zmiennych zależnych.

Wyniki

Wartości pól pod krzywymi emisji chemiluminescencji spontanicznej (BS) neutrofili spoczynkowych i po stymulacji fMLP, PMA i zymosanem nie wykazywały różnic istotnych statystycznie w porównaniach grup kobiet z osteoporozą, osteopenią i prawidłowymi wartościami gęstością masy kostnej (tab. I).

Wartości maksymalne chemiluminescencji spontanicznej neutrofili spoczynkowych i po stymulacji fMLP, PMA oraz zymosanem również nie wykazywały takich różnic we wszystkich badanych grupach pacjentek (tab. I).

Dyskusja

W niniejszej pracy nie wykazano statystycznie istotnych różnic w generacji reaktywnych form tlenu przez neutrofile kobiet z osteoporozą i osteopenią w porównaniu do pacjentek z prawidłowymi wartościami gęstości

Tab. I. Parametry chemiluminescencji spontanicznej (BS) neutrofili spoczynkowych i po stymulacji u pacjentek z prawidłowym BMD (grupa I), osteopenią (grupa II) i osteoporozą (grupa III)

		Parametry statystyczne	Parametry chemiluminescencji	
			Pole pod krzywą (mVxmin.)	Wartość maksymalna (mV)
BS (mVxmin.)	norma (n=22)	średnia±SD min.÷maks.	1339,6±809,5 515,1÷3434,0	66,2±37,0 21,9÷149,5
	osteopenia (n=28)	średnia±SD min.÷maks.	2137,3±1076,4 669,5÷3810,9	94,4±51,1 28,4÷203,3
	osteoporoza (n=26)	średnia±SD min.÷maks.	1702,9±857,1 558,2÷3576,6	76,7±41,9 22,7÷173,8
fMLP (mVxmin.)	norma (n=22)	średnia±SD min.÷maks.	4502,1±2628,8 1901,8÷10874,4	209,2±140,9 75,6÷597,6
	osteopenia (n=28)	średnia±SD min.÷maks.	4998,1±1939,8 2060,5÷7961,6	240,6±98,7 104,2÷508,3
	osteoporoza (n=26)	średnia±SD min.÷maks.	4161,2±1633,5 1789,5÷7518,9	183,8±72,1 81,5÷307,7
PMA (mVxmin.)	norma (n=22)	średnia±SD min.÷maks.	3361,2±3034,7 1010,3÷11984,9	231,4±191,3 59,3÷651,9
	osteopenia (n=28)	średnia±SD min.÷maks.	5078,9±2876,4 1939,6÷14679,3	322,6±203,0 102,7÷930,3
	osteoporoza (n=26)	średnia±SD min.÷maks.	4441,0±2949,8 1688,5÷12905,9	271,2±191,8 99,1÷817,9
Z (mVxmin.)	norma (n=22)	średnia±SD min.÷maks.	14973,7±7838,6 5567,0÷30051,2	814,6±371,2 313,1÷1731,0
	osteopenia (n=28)	średnia±SD min.÷maks.	19617,5±11176,6 6044,5÷46834,5	1088,8±579,6 499,3÷2640,4
	osteoporoza (n=26)	średnia±SD min.÷maks.	17458,0±12926,5 5354,7÷59049,4	880,3±520,6 344,1÷2473,0

masy kostnej. Z analizy dostępnego piśmiennictwa wynika rozbieżność wyników oceny roli generacji reaktywnych form tlenu w osteoporozie i różnorodność stosowanych metod badawczych.

W badaniach przeprowadzonych przez Sontakke i wsp. [10] na grupie 30 kobiet z osteoporozą menopauzalną, osteodystrofią pochodzenia nerkowego oraz osób po złamaniach kości stwierdzono, że toczące się u nich procesy przebudowy kostnej prowadzą do powstania stresu oksydacyjnego poprzez produkcję ROS. W innych badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Ali [11] na płodach szczurzych poddanych hipoksji i hiperoksji stwierdzono, że w stanach hipoksji obserwuje się wzmożony metabolizm tkanki kostnej charakteryzujący się wzrostem stężenia fosfatazy zasadowej, przebudową kolagenu itp. Wskazuje to na istotny wpływ warunków tlenowych na różnicowanie osteoblastów i przebudowę kości. Ozgocmen i wsp. [12] potwierdzili, że markery stresu oksydacyjnego, takie jak katalaza erytrocytów, dysmutaza nadtlenowa czy peroksydaza glutationu mogą być ważnymi wskaźnikami utraty masy kostnej.

Wydaje się, że ROS mogą odgrywać rolę w procesach utraty masy kostnej dwiema zasadniczymi drogami – hamowaniem formowania kości i stymulacją resorpcji kostnej. Największe znaczenie ma prawdopodobnie ta druga droga. Lean i wsp. [13] donoszą, że RANKL ma zdolność indukowania ROS jako fizjologicznej odpowiedzi biorącej udział w osi RANKL-TRAF6 (TNF-*receptor associated factor 6*)-oksydaza NADPH odpowiedzialnej za osteoklastogenezę. Ten szlak cytokinowo-enzymatyczny jest podstawowym elementem biorącym udział w różnicowaniu osteoblastów rdzeniowych. Doniesienia te potwierdzają także badania Bai i wsp. [14], którzy stwierdzili, że podwyższony poziom wewnątrzkomórkowych wolnych rodników stymuluje ekspresję RANKL na osteoblastach i przez to nasila różnicowanie osteoklastów. W powiązaniu z tymi procesami, zwłaszcza z generowaniem ROS, znajduje się estrogen, a właściwie jego niedobory. Wspomniany powyżej

autor zauważa, że u gryzoni po owariektomii spada wyraźnie poziom antyoksydantów tiolowych, które chronią m.in. przed wywołaną niedoborem estrogenów utratą masy kostnej. W takich samych warunkach niedoboru estrogenów dochodzi także do wzrostu RANKL i nasilenia różnicowania się zrębowych osteoblastów w osteoklasty, co doprowadza do wzrostu utraty kostnej. Oczywiście wiadomo, że ROS nie działają w tej mierze jako jedyny czynnik, ponieważ znany jest wpływ wielu cytokin (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, VEGF itp.) na ten proces. W badaniach przeprowadzonych przez Lean i wsp. [15] stwierdzono, że podawanie 17β-estradiolu zwiększa wyraźnie poziom dehydrogenazy glutationu (Gpx) w osteoklastach jednego z najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową degradację nadtlenku wodoru. Zauważono także, że wzrost Gpx prowadził do wyraźnego zahamowania różnicowania się osteoklastów. Pozostaje to w bezpośrednim związku z hamowaniem aktywacji NK-κB przez RANKL i TNF-α. Hall i wsp. [16] zauważają jednak, że ROS produkowane przez osteoklasty nie prowadzą bezpośrednio do resorpcji kości, ale zwiększają populację osteoklastów poprzez nasilenie ich formowania i hamowanie apoptozy wewnątrzkomórkowej. Jednak pojawiają się również doniesienia, które negują udział wolnych rodników w procesach związanych z osteoporozą. Oczywiście, jak wspomniano powyżej, udział ROS w tych procesach nie przekłada się bezpośrednio na utratę masy kostnej. Mody i wsp. [17] podają, że wolne rodniki, takie jak nadtlenek wodoru, mogą nawet hamować procesy utraty masy kostnej związane z różnicowaniem się osteoklastów poprzez m.in. hamowanie NF-κB. Z drugiej jednak strony wyniki badań, w których stosuje się leki hamujące powstawanie wolnych rodników przy zastosowaniu np. katalazy, wskazują na wyraźne zahamowanie utraty masy kostnej [15]. W innych badaniach przy wykorzystaniu leków z grupy SERM uzyskano podobne rezultaty, z tym że w tym przypadku ich efekt jest raczej związany bezpośrednio z wpływem na IL-6 i TNF-α, a pośrednio z wolnymi rodnikami, poprzez co następuje hamowanie różnicowania osteoklastów.

Z podanych powyżej danych z literatury można stwierdzić, że wpływ wolnych rodników na procesy utraty masy kostnej wydaje się być znaczący do zrozumienia tych mechanizmów. Szczególnie istotne jest to w przypadku kobiet w okresie menopauzy, kiedy to nakładają się 2 zjawiska stymulujące powstawanie wolnych rodników – po pierwsze niedobór estrogenów, po drugie zaś wynikający z wieku spadek poziomu substancji o znaczeniu antyoksydacyjnym.

Wnioski

Generacja reaktywnych form tlenu przez neutrofile we krwi kobiet po menopauzie z osteoporozą i osteopenią nie wykazuje istotnych różnic w porównaniu z parametrami tego zjawiska u pacjentek z prawidłową tkanką kostną.

Zasadne wydaje się podjęcie badań nad generacją ROS bezpośrednio w tkance kostnej.

Piśmiennictwo

1. Riggs BL, Khosla S, and Melton LJ III. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. J Bone Miner Res 1998; 13: 763-73.
2. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev 2000; 21: 115-37.
3. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 1996; 11: 1043-51.
4. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 1999; 20: 345-57.
5. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 2000; 15: 2-12.
6. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 7829-34.
7. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T cell production of TNF-α. J Clin Invest 2000; 106: 1229-37.
8. Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, et al. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. Endocrinology 1995; 136: 3054-61.
9. Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, et al. Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. J Bone Miner Res 1995; 10: 1365-73.
10. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. Clin Chim Acta 2002; 318: 145-8.
11. Ali M. The oxygen view of osteoporosis: bone homeostasis is but one face of oxygen homeostasis. Townsend Letter for Doctors and Patients 2005; 261: 86-93.
12. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, et al. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. Mol Cell Biochem 2007; 295: 45-52.
13. Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, et al. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. Endocrinology 2004; 146: 728-35.
14. Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. J Biol Chem 2005; 280: 17497-506.
15. Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. J Clin Invest 2003; 112: 915-23.
16. Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, et al. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. Biochem Biophys Res Commun 1995; 207: 280-7.
17. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radic Biol Med 2001; 31: 509-19.