

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

MUDr. Mária Luchavová



**Cirkadiánní rytmus parathormonu a kostní remodelace:
implikace pro léčbu osteoporózy teriparatidem (parathormon [1-34])**

Circadian rhythm of parathyroid hormone and bone remodeling:
implication for osteoporosis treatment with teriparatide (parathormone [1-34])

Disertační práce

Titul: MUDr. Vít Zikán, Ph.D.

Praha 2012

Poděkování

Pokládám za svoji milou povinnost poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku předkládané práce.

Poděkuji mému školiteli MUDr. Vítu Zikánovi, Ph.D. za pomoc, trpělivost a laskavý přístup během mého celého doktorandského studia. Svým vědomím jsem zavázaná také svým kolegům MUDr. Ivanu Raškovi, Ph.D. a MUDr. Daně Michalské, Ph.D. za pomoc a ochotu poradit.

Poděkuji paní Oldřice Lukáškové za precizní biochemickou analýzu, paní Evě Tiché za trpělivou práci v odborné ambulanci a laborantkám Janě Klenkové, Anně Matové a Markétě Urbánkové za přesné densitometrické měření.

Ráda bych se poděkovala prof. MUDr. Tomáši Svobodovi, DrSc., MBA, který mi jako přednostka III. interní kliniky 1. LF UK a VFN vytvořil podmínky pro zvládnutí doktorandského studia.

V neposlední řadě poděkuji své rodině za podporu a toleranci.

Seznam zkratek

CTX	C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CrossLaps)
BMD	Bone mineral density (denzita kostního minerálu)
BMI	Body mass index (index tělesné hmotnosti)
CASR	Calcium sensing receptor (kalcium senzitivní receptor)
FGF23	Fibroblast growth factor 23 (fibroblastový růstový faktor 23)
GH	Growth hormone (růstový hormon)
GK	Glukokortikoidy
iCa	Ionizované kalcium
IGF 1	Insulin-like growth factor 1 (Inzulínu podobný růstový faktor 1)
OPG	Osteoprotegerin
PINP	N-terminální propeptid prokolagenu typu I
PTH	Parathormon
RANKL	Ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappa B
TRAP5b	Tartarát rezistentní kyselá fosfatáza isoenzym5b
TPTD	Teriparatid (rekombinantní lidský N-terminální fragment molekuly parathormonu, PTH 1-34)
25-OHD	25 - hydroxyvitamin D

Obsah

	Pod kování	2
	Seznam zkratk	3
1	Úvod	5
1.1	Parathormon	6
1.2	Typy sekrece parathormonů	7
1.3	Regulace sekrece parathormonu a role kalcium sensing receptorů	8
1.4	Úinky parathormonu na kostní remodelaci	10
1.5	Faktory ovlivující sekreční variabilitu parathormonů	13
1.5.1	Nutriční faktory	13
1.5.2	Endokrinní faktory	14
	Hyperparatyreóza	14
	Pohlavní hormony	15
	Rostový hormon	15
	Hyperkortizolismus	16
	Tyreoidální hormony	17
1.5.3	Neuroendokrinní a nerogenní regulace rytmu parathormonu	18
1.6	Parathormon v léčbě osteoporózy	20
1.7	Chronofarmakoterapie	21
1.7.1	Chronofarmakoterapie osteoporózy	21
2	Cíle vlastní práce	23
3	Metodika	24
3.1	Metody studie I	24
3.2	Metody studie II	28
4	Výsledky	32
4.1	Výsledky studie I	32
4.2	Výsledky studie II	41
4	Diskuze	50
5	Závěr	55
6	Abstrakt	56
7	Seznam literatury	58
8	Seznam vlastních publikací autorů	77
9	Přilohy	80

1 Úvod

Franz Halberg položil základy chronobiologie zjištěním, že prakticky všechny biologické veličiny se pohybují v cyklech (Halberg, 1959). Biologické rytmy se u živých organismů vyskytují v různých periodách. U člověka oscilují od nejmenších časových jednotek (např. jedenkrát za vteřinu u elektroencefalogramu nebo jednou za několik vteřin u respiračního rytmu) až k rytmům, které oscilují jedenkrát za den (cirkadiánní rytmus), za rok (cirkumanuální rytmus) nebo za několik let.

Cirkadiánní rytmus je rytmus s periodou o délce přibližně jednoho dne (šestnáct až osmdesát hodin). Tento rytmus je řízen hierarchicky uspořádaným cirkadiánním systémem, který je tvořen oscilátory schopnými generovat rytmický signál. Vznik endogenního denního rytmu spočívá na molekulární úrovni v autoregulačních transkripčních a translacích z proteinových produktů (Reppert a Weaver, 2001; Relógio *et al.* 2011). Centrální oscilátor se nachází v suprachiasmatickém jádru předního hypotalamu. Řídí rytmus aktivity a odpovídá teplotě, hormonům, příjmu potravy a koordinuje činnost periferních oscilátorů, které se nacházejí téměř ve všech tkáních (Morse a Sassone-Corsi, 2002; Schibler a Sassone-Corsi, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000; Balsalobre, 2002). Hierarchická organizace cirkadiánního systému zajišťuje řád na časování fyziologických procesů a chování (Reppert a Weaver, 2002; Herzog, 2007; Hastings *et al.*, 2003). Podle některých studií jsou periferní oscilátory schopny udržovat cirkadiánní oscilace i bez přímého vlivu suprachiasmatického jádra (Yoo *et al.*, 2004). Centrální a periferní geny jsou synchronizovány se zevním prostředím prostřednictvím vstupních drah. Hlavním synchronizátorem biologických hodin je světlo a tma (Golombek *et al.*, 2010; Pittendrigh a Daan, 1976). Informace o změně světla a tmy jsou zprostředkovány retinohypotalamickým traktem (Weaver, 1998). Výstupní dráhy generují nervové a humorální signály, kterými je rytmický signál přenesen do periferních tkání (Leak a Moore, 2001).

Klinické studie hodnotící periodické rytmy biochemických markerů kostní remodelace svědčí pro diurnální variabilitu kostní resorpce i novotvorby (Wichers *et al.*, 1999; Qvist *et al.*, 2002; Eastell *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1992). Cirkadiánní studie genomu mezenchymálních buněk kostní dřeně a osteoblastů (Zvonic *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Grundberg *et al.*, 2008) vedly k závěru, že cirkadiánní geny mohou být asociovány s funkcí

osteoblast (Gimble *et al.*, 2009). Bylo prokázáno, že sympatikus interaguje s cirkadiánními geny *per* a *cry* v osteoblastech, a tím má vliv i na cirkadiánní rytmus kostní novotvorby (Harms *et al.*, 1994). Experimentální studie dokumentovaly, že delecce cirkadiánních genů *per* v osteoblastech vede k nárůstu BMD u myši (Fu *et al.*, 2005). Tyto výsledky podporují hypotézu, že fyziologický cirkadiánní rytmus je nezbytný i pro metabolismus kostních buněk a má význam pro uchování kvalitní kostní hmoty. Poruchy cirkadiánní variability PTH a fosfátů u lidí za různých patologických stavů, například u primární hyperparatyreózy (Logue *et al.*, 1990) nebo u postmenopauzální osteoporózy (Eastell *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1998; Ledger *et al.*, 1994) naznačují, že by úbytek kostní hmoty mohl souviset také s poruchou cirkadiánního rytmu PTH.

Kromě cirkadiánních změn v kostním a fosfokalciovém metabolismu byly popsány také cirkasemiánní změny osteoprotegerinu v séru, dielitého regulačního cytokinu osteoblast (Tarquini *et al.*, 2005), dále cirkumaniální změny 25-hydroxyvitaminu D, PTH, biochemických markerů kostní resorpce a BMD (Rapur *et al.* 2002; Viljakainen *et al.*, 2006) nebo i kolikaleté rytmy, kdy se akceleruje úbytek BMD u žen po menopauze v 7letých cyklech (Mazzuoli *et al.*, 2002, 2006).

1.1 Parathormon

Parathormon je lineární peptid obsahující 84 aminokyselin. PTH je syntetizován jako prekursorová molekula preproPTH (Habener *et al.*, 1979). PreproPTH je transportován do endoplazmatického retikula, po odštěpení 25 aminokyselin z něj vzniká proPTH, který je transportován do Golgiho komplexu, kde vzniká vlastní molekula parathormonu. Tato molekula přechází do sekrečních vezikul Golgiho komplexu, z kterých je PTH bu okamžitě secernován do cirkulace, degradován nebo transportován do zásobní hotovosti (pool) buky.

Degradace parathormonu začíná v hlavních buňkách přítomných v těle. V průběhu proteolytické digesce vznikají z PTH specifické fragmenty. Při přesunu sekrečních vezikul s obsahem PTH k lysosomům nastane kompletní degradace PTH, při spojení sekrečních granulek s vezikulami obsahujícími cystein proteinázu se z celé molekuly PTH odštěpí C terminální fragment (Hashizume *et al.*, 1993). Intaktní PTH tvoří jen 5-30% imunoreaktivního PTH. Poločas intaktního PTH je 2-5 minut (Tommasi *et al.*, 1995; Libutti *et al.*, 1999).

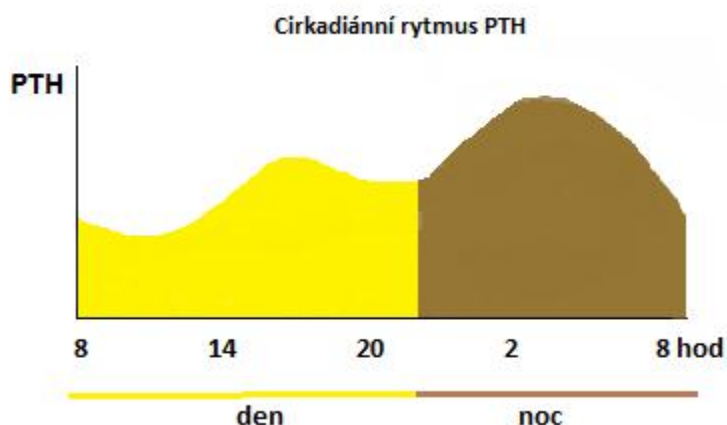
Cirkulující PTH molekuly jsou tedy imunoheterogenní (Bernson *et al.*, 1968), jsou secernovány bu přímo tělešnými buňkami anebo generovány periferním metabolismem PTH (1-84) především v játrech (Nguyen-Yammoto *et al.*, 2002). Ledviny degradují PTH (1-84) a C

terminální fragment PTH. To vysvětluje zjištění, že při renální insuficienci dochází k akumulaci C terminálního fragmentu PTH (Brossard *et al.*, 1996; Kazama *et al.*, 2003). N terminální fragment (1-34) má plnou biologickou aktivitu PTH (Tregear *et al.*, 1973) díky vazbě na PTH 1/ PTHrP receptory (Jüppner *et al.*, 1991) a aktivaci proteinkinázy A a C (Abou-Samra *et al.*, 1992). Předpokládalo se, že C terminální fragment (PTH 37-84, PTH 34-84) nemá biologickou funkci, vzhledem k tomu, že se neváže na PTH 1 (PTH receptor typu 1) / PTHrP (PTH related peptide) receptory (Rosenblatt *et al.*, 1978; Pines *et al.*, 1994). Recentní práce však ukazují, že C terminální fragment PTH má pravděpodobně jiný receptor a zejména i opačné účinky oproti PTH (1-84) a PTH (1-34) (Murray *et al.*, 2005; Scillitani *et al.*, 2011).

1.2 Typy sekrece parathormonu

U zdravých jedinců je PTH vylučován v konstantní sekreci v pulzech, které se opakují zhruba každých 8,5 min (rozmezí 5-12 min) (Schmitt *et al.*, 2005). V sedmdesátých letech 20. století byl dokumentován cirkadiánní rytmus sekrece PTH (Jubiz *et al.*, 1972). Studie zabývající se variabilitou intaktního PTH 1-84 potvrdily dvoufázový rytmus s menším, ale významným vzestupem koncentrace PTH mezi 16:00 a 19:00 hod a s větším vrcholem mezi 02:00 a 06:00 hod ránní. Významný pokles koncentrace PTH se vyskytoval dopoledne s minimem pravděpodobně mezi 10:00 a 11:00 hod (el Hajj Fulehain *et al.*, 1997). Cirkadiánní rytmus PTH je znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1.1 Cirkadiánní rytmus PTH



Upraveno podle el Hajj Fulehain *et al.*, 1997

Bylo prokázáno, že rytmus PTH je synchronizován s hladinou vápníku, fosfát a marker kostní remodelace (Joseph *et al.*, 2007). Fyziologická funkce PTH rytmu není zcela objasněna. Základní rytmus PTH rytmu je endogenní (el Hajj Fulehain *et al.*, 1997) a různé vnější faktory, jako jsou dietní faktory (Blumsohn *et al.*, 1994; Calvo *et al.*, 1990; Fraser *et al.*, 1994), endokrinní, neuroendokrinní nebo nervové faktory (Joseph *et al.*, 2008; Logue *et al.*, 1992; Schmitt *et al.*, 2003) mohou jeho amplitudu modulovat. Faktory, které se podílejí na regulaci diurnální variability PTH a kostní remodelace jsou ale zatím stále předmětem výzkumu.

U žen s postmenopauzální osteoporózou byla popsána ztráta cirkadiánního rytmu PTH a byly pozorovány další abnormality v sekreci PTH (Eastell *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1998; Ledger *et al.*, 1994). Přítomnost těchto abnormalit sekrece PTH není známa. Oploštění nebo ztráta cirkadiánního rytmu PTH může vést ke změně citlivosti kostních buněk na PTH s následnou poruchou osteoresorpce nad novotvorbou kosti, vyúsujícím ve ztrátu kortikální kostní hmoty. Změny v endogenní sekreci PTH ovlivní proces kostní remodelace a mohou přispívat ke vzniku osteoporózy. Vyskytují se u některých endokrinních onemocnění, jako je primární nebo sekundární hyperparatyreóza, akromegalie či nedostatek růstového hormonu v dospělosti. Hormony mohou ovlivňovat citlivost kosti na účinky PTH a/nebo sekreci PTH. Je potěbné objasnit, zdali jsou změny PTH rytmu primární, nebo sekundární v důsledku patologického stavu skeletu (Fraser *et al.*, 2004).

1.3 Regulace sekrece parathormonu a role kalcium sensing receptoru

Přítomnost kalcia vylučuje PTH jako reakci na mírný pokles ionizovaného vápníku v krvi v zájmu udržení normokalcémie. Na plazmatické membráně hlavních buněk periferních tkání se vyskytují kalcium senzitivní (sensing) receptory (CaSR), které hrají ústřední roli v kontrole sekrece PTH a působí jako senzory cirkulující hladiny extracelulárního ionizovaného vápníku (Chen a Goodman, 2004).

CaSR je exprimován převážně v hlavních buňkách periferních tkání a v tubulárním systému ledvin, přesněji na bazolaterálním povrchu buněk tlustého vzestupného raménka Henleho kličky (Chattopadhyay *et al.*, 1996). CaSR je exprimován také v C-buňkách štítné žlázy, v tenkém stěvě, v kosti, v mozku, v epidermis a v buňkách epitelu obličeje. V těchto tkáních je jeho funkce zatím neobjasněna. Předpokládá se, že není zapojena do regulace homeostázy kalcia (Thakker, 2004). CaSR je členem receptorů spojených s G-proteiny (Brown a MacLeod, 2001). Skládá se z extracelulární, intracelulární a centrální domény, kterou tvoří sedm transmembránových domén spojených těmi intracelulárními a

extracelulárnými klickami (Brown *et al.*, 1997), které jsou zapojeny do aktivace fosfolipázy C (Chang *et al.*, 2000).

Aktivace CaSR je spojena s navázáním iontů kalcia v extracelulární doméně CaSR. Ionty kalcia se nejprve váží s nízkou afinitou, jakmile však jejich množství přesáhne určitý práh, váží se silněji a vedou k uzavření této části CaSR, což navodí změnu konformace transmembránové domény a změnu nitrobuněného signálu (Hu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001), která bezprostředně vede k snížení sekrece PTH. Aktivace CaSR v delším časovém horizontu je spojena také se snížením genové exprese PTH a s inhibicí buněčné proliferace (Hjalm *et al.*, 2001). Mezi změnami kalcémie a sekrecí PTH je sigmoidální závislost. Snížení ionizovaného plazmatického kalcia vede k inaktivaci CaSR s následnou rychlou sekrecí PTH. Akutní hypokalcémie vyvolává okamžitě uvolnění PTH ze sekrečních granul. Hypokalcémie trvající cca 20-30 min způsobí snížení intracelulární degradace PTH. Po přibližně hodinu trvající hypokalcémii dochází k zvýšení genové exprese PTH. Dlouhotrvající hypokalcémie (např. při chronické renální insuficienci) je spojena se zvýšenou proliferací buněk periferních tkání (Brown, 2000).

V poslední době je intenzivně studována interakce mezi PTH a FGF23 (Fibroblast growth factor 23). FGF23 je cirkulující faktor produkovaný osteocyty (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). FGF se váže na jeden ze 4 transmembránových receptorů z rodiny FGFR 1-4 (FGF receptor 1-4), který je spojen s tyrozinkinázovou aktivitou (Yu *et al.*, 2005). K aktivaci FGFR receptoru prostředkováné FGF 23 je nezbytný transmembránový protein Klotho, který funguje jako kofaktor aktivace FGF signalizace (Kurosu *et al.*, 2006). Přítomnost receptoru FGFR společně s Klotho pravděpodobně definuje tkáňovou specifitu k účinkům FGF23 (Urakawa *et al.*, 2006; Kurosu *et al.*, 2006). Exprese Klotho a FGFR byla zjištěna v buňkách periferních tkání, ledvin, choroidálního plexu a hypofýzy. Tyto orgány se jeví jako cílové pro FGF 23 (Li *et al.*, 2004). FGF 23 inhibuje renální reabsorpci fosfátu a aktivitu 1alfa-hydroxylázy v ledvinách (Shimada *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001). Experimentální studie prokázaly, že FGF 23 inhibuje syntézu a sekreci PTH v periferních tkáních (Ben *et al.*, 2007; Krajisnik *et al.*, 2007).

Studie in vivo i in vitro ukazují, že vysoká koncentrace fosfátu přímo stimuluje sekreci PTH (Almaden *et al.*, 1996; Kilav *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1996). Byl objeven fosfátový kotransportér (Tatsumi *et al.*, 1998), který může fungovat jako šfosfátový senzor lokalizovaný na buňkách periferních tkání (Miyamoto *et al.*, 1998). Zatím chybí poznatky o další intracelulární signalizaci fosfátového senzoru.

1.4 Úinky parathormonu na kostní remodelaci

Kromě regulace homeostázy kalcia se PTH významně uplatňuje v řízení kostní remodelace (Jilka, 2007). PTH působí přes receptor spájený s G proteiny (PTH 1R), který na svém povrchu exprimují buňky osteoblastické řady (osteoblasty, osteocyty a kostní povrchové buňky) a nikoli osteoklasty. Na osteoklastech byly popsány jen nízkoafinitní receptory pro PTH (Gay *et al.*, 2003). Po vazbě PTH na PTH1R dochází k aktivaci jak adenylátcyklázy (cAMP) proteinokinázy, tak fosfolipázy C/ proteinkinázy C (Villardaga *et al.*, 2001). Úinky PTH na osteoklasty jsou zprostředkovány především zvýšenou expresí cytokinu RANKL (ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappa B) na buněčném povrchu stromálních buněk a dalších buněk osteoblastické řady (Fu *et al.* 2002; O'Brien *et al.* 2008). RANKL zvyšuje jak osteoklastogenezi, tak aktivitu zralých osteoklastů. Naproti tomu další peptid produkovaný osteoblasty OPG (osteoprotegerin) působí jako šifalovaný receptor pro RANKL (receptor aktivující nukleární faktor kappa B), zabráňuje osteoklastogenezi a resorpci kosti inhibiční interakce mezi RANKL-RANK. (Obr. 1.2a). Bylo prokázáno, že subkutánní podávání lidského PTH (1-38) vyvolá přechodné snížení OPG mRNA a zvýšení mRNA RANKL v kostech potkanů. Naopak, kontinuální infuze lidského PTH (1-38) je spojena s dlouhodobou inhibiční sekrecí OPG a trvalou stimulací produkce RANKL (Ma *et al.*, 2001), (Obr. 1.2b).

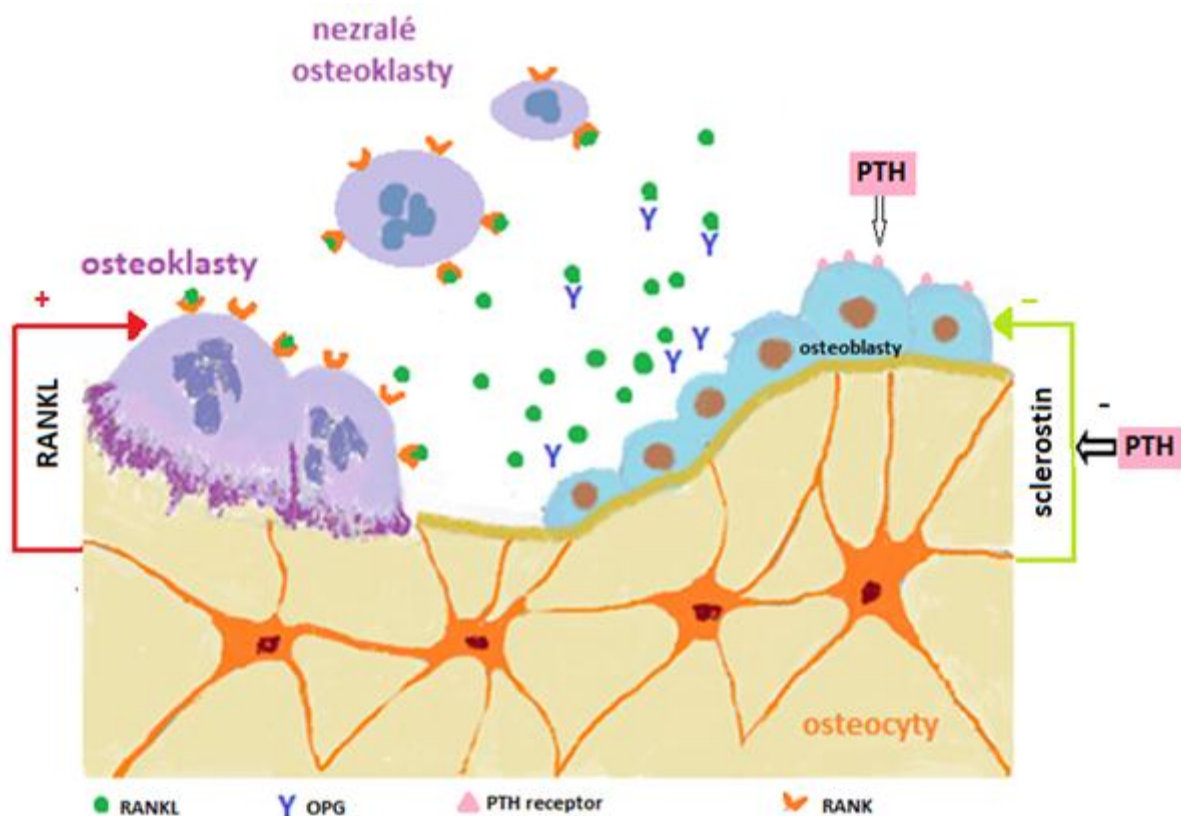
Léčba exogenním PTH má na kost anabolické i katabolické úinky v závislosti na koncentraci a délce expozice PTH (Dobnig *et al.*, 1997). Posun rovnováhy mezi kostní formací a resorpcí ve prospěch ztráty nebo nárůstu kostní hmoty závisí na způsobu aplikace PTH. Intermitentní podávání PTH působí na kost anabolicky. Naopak PTH ve formě kontinuální infuze v dávkách, které působily anabolicky, pokud byly podávány jednorázově, indukuje vysokou kostní resorpci a hyperkalcémií (Hock a Gera, 1992). U pacientů s primární hyperparatyreózou je dlouhodobě zvýšená hladina PTH spojena s hyperkalcémií a s úbytkem kostní hmoty, zejména kortikální kosti (Mosekilde, 2008).

Recentní studie odhalily, že pro osteoanabolické působení PTH má významnou roli také receptor pro PTH na osteocytech (O'Brien *et al.*, 2008). Osteocyty jsou nejhodnotnější kostní buňky, které slouží jako tzv. mechanosenzory skeletu, koordinují kostní remodelaci (Xiong a O'Brien, 2012) a rovněž fosfátovou (Cheng a Hulley, 2010) a pravděpodobně i kalciovou homeostázu (Powell Jr *et al.*, 2011). Nové práce ukazují, že hlavním zdrojem RANKL ve skeletu jsou právě osteocyty (Xiong a O'Brien, 2012). Osteocyty jsou i hlavním zdrojem sclerostinu, dalšího významného inhibitoru kostní novotvorby (van Bezooijen *et al.*, 1996).

Bylo zjištěno, že PTH potlačuje produkci sclerostinu osteocyty (Keller a Kneissel, 2005; Kramer *et al.*, 2010) a může tak dále přispívat k osteoanabolickému působení PTH.

Je dobře známo, že pulzatilita hormonu může modulovat citlivost cílových orgánů na daný hormon. Kontinuálně zvyšující se koncentrace PTH vede ke ztrátě citlivosti kostních buněk na PTH (Maruani *et al.*, 2003). Cirkadiánní rytmus PTH by tedy mohl mít význam i pro regulaci kostní remodelace. Bylo prokázáno, že také OPG vykazuje cirkadiánní rytmicitu u zdravých osob s denním vzestupem a nočním poklesem koncentrace OPG (Joseph *et al.*, 2007). Koncentrace OPG byla nepřímo úměrná koncentraci PTH a markeru kostní resorpce (CTX). U zdravých postmenopauzálních žen byl vztah mezi PTH a OPG narušen a byl pozorován signifikantní vztah s nízkým poklesem koncentrace OPG v séru ve srovnání se zdravými premenopauzálními ženami a staršími muži (Joseph *et al.*, 2007). Zdá se tedy, že vyšší nárost kostní resorpce u postmenopauzálních žen v noci souvisí s vztahem s nočním poklesem koncentrace OPG. Ověření hypotézy, že změny cirkadiánního rytmu PTH souvisí i se změnami OPG/RANKL systému, ale vyžaduje další studie.

Obrázek 2a Úinky parathormonu na kostní remodelaci

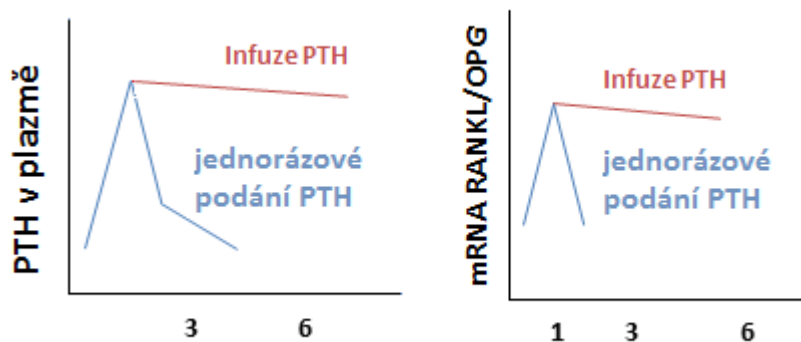


Obrázek .2a

Parathormon (PTH) stimuluje sekreci RANKL (ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappu B), který je produkován v osteoblastech a osteocytech. RANKL zvyšuje osteoklastogenezi a aktivitu osteoklastů na vázání na RANK (receptor aktivující nukleární faktor kappu B) na osteoklastech a jejich prekurzorech. OPG (osteoprotegerin) je produkován osteoblasty, působí jako šlechtěný receptor pro RANKL, navázáním na RANKL inhibuje interakci mezi RANKL-RANK receptorem na osteoklastech. PTH potlačuje také produkci sclerostinu (Kramer et al., 2010), a tím tlumí inhibiční efekt sclerostinu na kostní novotvorbu (van Bezooijen *et al.*, 1996).

Obrázek . 2b

Schematické zobrazení změny poměru mRNA RANKL a OPG a koncentrace parathormonu v plazmě při kontinuální infuzi parathormonu a po jeho jednorázovém podání.



Jednorázová subkutánní aplikace lidského PTH (1-38) vede k přechodnému zvýšení koncentrace PTH v plazmě. V experimentu u potkanů vyvolala přechodné snížení mRNA pro OPG (osteoprotegerin) a zvýšení mRNA pro RANKL (ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappu B) s maximem za 1 hodinu po aplikaci a s návratem k bazálním hodnotám do 2 hodin. Naopak, kontinuální infuze lidského PTH (1-38) je spojena s dlouhodobou inhibicí sekrece OPG a trvalou stimulací produkce RANKL (Ma *et al.*, 2001, Onyia *et al.*, 2000).

1.5 Faktory ovlivňující cirkadiánní variabilitu parathormonu

1.5.1 Nutriční faktory

Během laňní se oplo–uje cirkadiánní rytmus PTH (Fraser et al., 1994), stejn jako cirkadiánní rytmus marker kostní resorpce (Schlemmer *et al.*, 1999). Podání glukózy, vápníku, bílkovin, tuk nebo smí–ené potravý vede k akutnímu snížení marker kostní resorpce aíl o 50% bazálních hodnot (Henriksen *et al.*, 2003; Blumsohn *et al.*, 1994; Clowes *et al.*, 2002). Markery kostní resorpce klesají jííl dvacet minut po jídle a bazálních hodnot nabývají asi –est hodin po jídle. Markery kostní formace jsou rovn íl ovlivn ny p íjmem potravý, ale pokles marker kostní novotvorby je ve srovnání s markery kostní resorpce men–í. Z toho plyne, íle p íjmem potravý moduluje kostní remodelaci ve prosp ch kostní novotvorby (Walsh *et al.*, 2010). Regulace odezvy kostních bun k na p íjmem potravý je komplexní a má pravd podobn n kolik mediátor . Známe jsou st evní peptidy GIP (glucose- dependent insulinotropic peptide), GLP-1 (glucagon like peptide -1), GLP-2 (glucagon like peptide -2) a pankreatické peptidové hormony bun k, které p sobí p ímo na kostní bu ky (Bollag *et al.*, 2000; Pacheco-Pantoja *et al.*, 2011). Uplatnit se mohou také gastrointestinální hormony z rodiny neuropeptidu Y, které p sobí prost ednictvím centrálního nervového systému (Wortley *et al.*, 2007).

Studie zabývající se biochemickými markery kostní resorpce ukázaly, íle podání GLP-2 v 22:00 hod vedlo k snížení no ní resorpce u postmenopauzálních ílen (Henriksen et al., 2004). Suplementace vápníkem ve ve erních hodinách (1000 mg kalcia v 23 hod po dobu 14 dn) oslabil no ní vzestup PTH i marker kostní resorpce (N-terminální telopeptid a deoxy pyridinolin v mo í). Naopak ranní suplementace kalcíem nem la významný vliv na celkovou denní exkreci marker kostní resorpce (Blumsohn *et al.*, 1994). Tyto údaje nazna ují, íle vhodné na asování podání kalcia, m íle být d íleflité k ovlivn ní rytmu PTH a jeho ú inku na kostní resorpci. Fraser a spol. (1994) prokázali, íle cirkadiánní rytmus fosfát a PTH v séru jsou si velmi podobné s tím rozdílem, íle akrofáze rytmu sérových fosfát p edchází zm nám koncentrací PTH. U postmenopauzálních ílen s osteoporózou bylo prokázáno oplo–t ní no ního vzestupu koncentrace fosfát a PTH v séru (Fraser *et al.*, 1994). P íina t chto zm n v pr b hu no ního la n ní zatím nebyla objasn na. P edpokládá se, íle podání fosfátu u t chto postmenopauzálních ílen s osteoporózou v noci stimuluje zvý–ení sekreci PTH a vápník podaný v ranních hodinách obnovuje endogenní cirkadiánní rytmus PTH (Fraser *et al.*, 2004). Dlouhodobé studie zabývající se touto hypotézou zatím nebyly provedeny.

Silverberg a spol. (1989) sledovali efekt perorálního podávání fosfátů po dobu 5 dnů u zdravých postmenopauzálních žen, u žen s osteoporózou a u mladých zdravých jedinců. U žen s osteoporózou nebyl pozorován na váhu závislý vzestup koncentrace PTH na rozdíl od zdravých postmenopauzálních žen a byla prokázána snížená produkce 1,25(OH)₂ vitamínu D₃. Příčina této obleněné reakce PTH na perorální podání fosfátů u osteoporotických žen zatím nebyla objasněna. Výsledky podporují hypotézu, že při osteoporóze dochází k abnormální odpovědi sekrece PTH při nížními tlásky (Silverberg *et al.*, 2001).

Podávání fosfátů vede pravděpodobně k změně FGF23. Dieta s vysokým obsahem fosfátů a kalcia (2880 mg a 1700 mg/den) vedla k zvýšení sérové koncentrace FGF23 a poklesu PTH u mladých zdravých osob ve srovnání s dietou s nízkým obsahem fosfátů a kalcia (850 mg a 280 mg/den). Vyšší koncentrace FGF23 byly asociovány s fosfaturíí a poklesem 1,25- dihydroxyvitamínu D (Vervloet *et al.*, 2011).

1.5.2 Endokrinní faktory

Hyperparatyreóza

Změny ve variabilitě koncentrace PTH jsou způsobeny změnami v syntéze PTH a jeho sekreci. U pacientů s primární hyperparatyreózou byla prokázána ztráta cirkadiálního rytmu PTH, který je obnoven po chirurgickém odstranění adenomu (Logue *et al.*, 1990). Kromě primární hyperparatyreózy byla ztráta cirkadiálního rytmu PTH dokumentována u pacientů s pseudohyperparatyreózou (Gallagher *et al.*, 1991). Sekundární hyperparatyreóza je charakterizována proporcíálním zvýšením jak pulzní tak tónické komponenty sekrece PTH, poklesem clearance PTH v závislosti na poklesu glomerulární filtrace, který odpovídá za dvou- až trojnásobné zvýšení hodnoty plazmatického PTH (Santamaria *et al.*, 2003). Zvýšení sérové koncentrace PTH v závislosti na váhu, které bylo pozorováno jak u mužů, tak u žen, může být způsobeno zvýšením kostní resorpce (Ledger *et al.*, 1995) a ztrátou kortikální kostní hmoty (Mosekilde, 2008). Předpokládá se, že nedostatek vitamínu D, snížená aktivita renální 1 α -hydroxylázy a nízká absorpce vápníku stejně mohou přispět k sekundární hyperparatyreóze u starší populace. Ledger a spol. (1994) prokázali, že starší ženy mají zvýšenou sekreci PTH na hypokalcémii indukovanou pomocí infuze s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a mají také vyšší nesupresibilní složky sekrece PTH. Je zajímavé, že tyto abnormality vymizely po týdnu terapie aktivním vitaminem D₃.

Pohlavní hormony

Deficit estrogenů je hlavní příčinou vzniku osteoporózy u postmenopauzálních žen (Garnero *et al.*, 1996). Estrogeny napomáhají k udržení rovnováhy mezi kostní novotvorbou a kostní resorpcí. Kromě toho estrogeny ovlivňují homeostázu vápníku úinkem na jeho střevní a renální absorpci. Předpokládá se, že nedostatek estrogenů spolu s deficitem vitamínu D, se sníženou aktivitou renální 1 α -hydroxylázy a s nízkým příjmem vápníku, přispívá k rozvoji sekundární hyperparatyreózy u starší populace. U postmenopauzálních žen, které byly dlouhodobě léčené estrogeny, nebyl pozorován na věku závislý vzestup PTH v séru (Vincent *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že deficit estrogenů i testosteronu zvyšuje citlivost kostních buněk na PTH (Khosla *et al.*, 1998). Ledger a spol. (1995) prokázali, že potlačení sekrece PTH (po podání 24 hodinové infuze kalcia) vedlo k většímu poklesu markerů kostní resorpce u starších žen než u premenopauzálních žen. Naproti tomu u mladších mužů (ve věku 40-50 let) došlo k výraznějšímu snížení kostní resorpce ve srovnání se staršími muži ve věku 70-78 let (Kennel *et al.*, 2003). Autoři uvádí, že starší muži, na rozdíl od postmenopauzálních starších žen, mají pouze parciální nedostatek pohlavních hormonů. Zdá se, že právě tímto mechanismem jsou starší muži relativně chráněni před osteoresorpcí úinkem PTH. Cirkadiánní rytmus intaktního PTH v séru se liší mezi pohlavím, u mužů byl pozorován vyšší a širší vzestup PTH v noci (Calvo *et al.*, 1991). U postmenopauzálních žen s osteoporózou bylo zjištěno další snížení nočních hladin PTH (Eastell *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1998). K poklesu koncentrace PTH došlo od 22:00 do 07:00 hodin (Fraser *et al.*, 1998). Snížení amplitudy nočního vrcholu PTH vede k většímu ztrátám vápníku ledvinami a tím dále přispívá k úbytku kostní hmoty (Eastell *et al.*, 1992). Dosud nebylo zjištěno, jestli hormonální substituční léčba může obnovit cirkadiánní rytmus PTH u mužů i žen s osteoporózou. V jiném studiu bylo zjištěno, že substituční terapie estrogeny snižuje pulzní sekreci PTH u žen po menopauze (Harms *et al.*, 1994).

Růstový hormon

Produkce růstového hormonu (GH) vrcholí během prvních dvou hodin spánku. Při spánkové deprivaci jeho produkce klesá. GH hraje důležitou roli v kostním metabolismu. Ukazuje se, že se GH uplatňuje v regulaci sekrece PTH. Plný anabolický efekt PTH na kost vyžaduje součinnost systému GH/IGF-1 (inzulínu podobný růstový faktor 1), (Hock *et al.*, 1990; Bikle *et al.*, 2008). Akromegalie je spojena se skeletálními změnami charakterizovanými apozitivním růstem kostí, zejména rozměry kostí a zvýšením kostního obrátu (Ezzat *et al.*, 1993). Korelace mezi koncentrací PTH a markery kostního obrátu

mezi aktivní a lé enou akromegalií vedlo hypotéze, že ú inek GH/IGF-1 systému na kost je zprost edkován právě PTH. Aktivní akromegalie zvyšuje spontánní pulzatilitu PTH, prodloužením doby trvání pulzu PTH a zvý-ením obsahu PTH v jednotlivém pulzu (Mazzioti *et al.*, 2006). Biochemická lé ba akromegalie má za následek zvý-ení hladiny PTH a snížení hladiny nefrogenní cAMP (cyklický adenosin monofosfát, marker renální aktivity PTH), sérového kalcia a koncentrace marker kostního obratu (White *et al.*, 2006).

Deficit r stového hormonu v dosp losti (AGHD) je asociován se sníženou citlivostí kostní tkán na PTH a s abnormálním cirkadiánním rytmem PTH (White *et al.*, 2007). Pro AGHD je typické snížení kostního obratu a zvý-ený výskyt osteoporózy. Substitu ní terapie r stovým hormonem zvyšuje BMD u pacient s AGHD, obnovuje citlivost kosti vůči PTH, obnovuje cirkadiánní rytmus PTH a rovn ěl upravuje cirkadiánní variabilitu kostní remodelace a s tím související změny v metabolismu kalcia a fosfát (White *et al.*, 2005).

Joseph a spol. (2008) prokázali, že pokles GH/IGF-1 s v kem může přispívat k abnormalitám PTH rytmu a k snížení ú inku PTH na kostní a renální bu ky u postmenopauzálních žen s osteoporózou. V této studii bylo také dokumentováno, že lé ba r stovým hormonem snížila cirkulující hladiny PTH, obnovila cirkadiánní rytmus PTH a zvý-ila citlivost cílových bun k na PTH. Zvý-ená citlivost bun k na ú inky PTH vedla k zvý-ení marker kostní remodelace, stejn ě jako cAMP v mo ěi. Zatím nebylo objasn ěno, zdali jsou tyto změny rytmu PTH kauzální nebo tvo í reakci na patologický stav.

Hyperkortizolismus

Hlavním mechanismem úbytku kostní hmoty u glukokortikoidy indukované osteoporózy je snížení kostní novotvorby v ěsledku přímého vlivu na bu ky osteoblastické linie (Lukert a Raisz, 1990), ale může se uplatnit i nepřímý a nepřímý stimula ní vliv na osteoklasty s přechodn ě zvý-enou osteoresorpcí (Moutsatsou *et al.*, 2012).

Glukokortikoidy (GK) působí na kost také nepř ímo. Př ímo glukokortikoidy jsou inhibovány osy hypotalamus/hypofýza/ gonadální a GH/IGF-1. Krom ě toho mají GK také vliv na sekre ní dynamiku PTH snížením tónické sekrece PTH a zvý-ením jeho pulzní sekrece (Bonadonna *et al.*, 2005). Abnormality v sekre ní dynamice PTH mohou odrážet jak přímý tak nepřímý vliv GK na př ítná t líska nebo na aktivitu kostních bun k. Lé ba subkutánním PTH jednou denn ě u pacient dlouhodob ě lé ených nízkými dávkami GK vyústila v ěste nou inhibici PTH-indukované stimulaci kostní formace (Oxlund *et al.*, 2006). Snížení kostní odpov ědi na lé bu PTH může být ěste n vysv tleno zm ěnami GH/IGF-1 osepř ímo GK. Podávání GH může oslabovat n které negativní ú inky chronické lé by GK na

kostní metabolismus (Mauras, 2009). Kromě toho mohou také abnormality v endogenní sekreci rastového hormonu změnit rytmus PTH (Ahmad *et al.*, 2003). Předpokládá se, že změny v sekreční dynamice PTH by mohly být i v důsledku zatím neznámé signalizace z kosti na pituitární tělísko (Bonadonna *et al.*, 2005). Tyto signály jsou předmětem intenzivního studia. Bylo zjištěno, že FGF23, který je syntetizován v osteocytech, je schopen potlačit vylučování PTH a genovou expresi PTH u potkanů (Galitzer *et al.*, 2008). Samadham a spol. (2009) prokázali, že novotvorba kosti působí jako silný modulátor produkce FGF23 a má vliv na jeho uvolňování do oběhu. Vzhledem k tomu, že GK mají pozitivní proapoptotický efekt na osteoblasty a osteocyty (O'Brien *et al.*, 2004), lze předpokládat, že GK mohou způsobovat změny v produkci FGF23 i abnormality v sekreci FGF23, a tak mohou mít vliv na sekreční dynamiku PTH. K ověření této hypotézy jsou však nutné další studie.

Tyreoidální hormony

Hormonální flázy ovlivňují kostní remodelaci. Zvýšení koncentrace hormonální flázy indukuje zvýšení jak osteoblastické tak osteoklastické aktivity. Osteoporóza asociována s hypertyreózou je tradičně vnímána jako sekundární důsledek nadměrné sekrece thyreoideálních hormonů. Existují ale také důkazy o tom, že i TSH má přímý účinek na osteoklasty a prekurzory osteoklastů prostřednictvím TSH receptoru (Abe *et al.*, 2003). Nízké hladiny TSH způsobují pokles BMD (Galliford *et al.*, 2005). Hypertyreóza byla asociována s mírnou hyperkalcémií a sníženou sekrecí PTH (Mosekilde a Christensen, 1977). U některých pacientů s tyreotoxikózou byl cirkadiální rytmus markeru kostní resorpce vyhlazen (Fraser *et al.*, 2004). Naopak primární hypotyreóza vede ke snížení kostní remodelace, je snížená senzitivita kosti na hypokalcémií a bazální sekrece PTH se zvyšuje (Castro *et al.*, 1975). U pacientů s hypotyreózou dosud nebyly studovány změny v pulzní nebo cirkadiální variabilitě PTH.

1.5.3 Neuroendokrinní a neurogení regulace rytmu parathormonu

Neurogení a neurohumorální faktory by se mohly také uplatňovat v regulaci sekrece PTH. V této souvislosti byl nejvíce studován vztah mezi prolaktinem a sekrecí PTH. Koncentrace prolaktinu v séru vykazuje významnou cirkadiánní variabilitu a prolaktin je schopen přímo stimulovat sekreci PTH *in vitro* (Magliola *et al.*, 1984). Logue a spol. zjistili silnou korelaci mezi endogenní sekrecí PTH a koncentrací prolaktinu v séru, kde změny v PTH sekreci přecházely změnami v koncentraci prolaktinu (1984). Tento vztah byl negativně ovlivněn narušením vzorce spánku (Logue *et al.*, 1992). Zatím nebyly provedeny další klinické studie, které by se zabývaly variabilitou PTH například u pacientů s prolaktinomy. Schmitt a spol. (2003) poukázali, že také sympatický nervový systém má modulační vliv na pulzní sekreci PTH. Selektivní alpha adrenergní blokátory akutně zvýšily plazmatickou koncentraci PTH tím, že zvýšily obsah PTH v jednom pulzu, ale neovlivnily rytmicitu pulzní sekrece PTH. U uremických pacientů po totální paratyroidektomii a následné heterotopické autotransplantaci tkáně periférních tělísek byla oscilační sekrece PTH přechodně ztracena. Během několika měsíců se oscilace PTH obnovila zejména v souvislosti s funkční reinervací autotransplantované tkáně (Fu *et al.*, 2002). Existuje možnost, že nervové regulace mohou hrát roli v regulaci sekrece PTH.

Bylo prokázáno, že sympatikus interaguje s cirkadiánními geny *per* a *cry* v osteoblastech, a tím může ovlivňovat cirkadiánní rytmus kostní novotvorby (Harms *et al.*, 1994). Experimentální studie dokumentovaly, že delece cirkadiánních genů *per* v osteoblastech vede k nárůstu BMD u myši (Fu *et al.*, 2005). Dosud nebylo prozkoumáno, jestli neurální regulace ovlivňuje rovněž cirkadiánní geny v buňkách periférních tělísek.

Abnormality cirkadiánního rytmu a pulzní sekrece PTH u endokrinopatií jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka . 1

Změny v sekreci PTH a v senzitivitě skeletu k PTH u vybraných endokrinopatií

Hormon	Citlivost kosti k PTH	Sekretoryní dynamika PTH	Cirkadiánní rytmus PTH
Rostový hormon / IGF-1	Snížená při deficitu (White <i>et al.</i> , 2005) Zvýšená při nadbytku (White <i>et al.</i> , 2006)	Narušená při nadbytku (Mazzioti <i>et al.</i> , 2006)	Narušen při deficitu (White <i>et al.</i> , 2005) Narušen při nadbytku (White <i>et al.</i> , 2006)
Estradiol	Snížená při deficitu (Khosla <i>et al.</i> , 1998)	Snižuje pulzní sekreci PTH (Harms <i>et al.</i> , 1994)	Narušen u postmenopauzálních žen s osteoporózou (Eastell <i>et al.</i> , 1992; Fraser <i>et al.</i> , 1998)
Testosteron	Zvýšená při deficitu (Khosla <i>et al.</i> , 1998)	Nebyla testována	Nebyl testován
Kortizol	Snížená při nadbytku (Oxlund <i>et al.</i> , 2006)	Zvyšuje pulzní sekreci PTH (Bonadonna <i>et al.</i> , 2005)	Nebyl testován
TSH - trijodthyronin	Snížená při deficitu (Castro <i>et al.</i> , 1975)	Nebyla testována. Při nadbytku byla zjištěna nižší bazální koncentrace PTH, při nedostatku vyšší PTH (Castro <i>et al.</i> , 1975).	Nebyl testován
Prolaktin	Nebyla testována	Nebyla testována Při nadbytku byla zjištěna vyšší bazální koncentrace PTH (Raymond <i>et al.</i> , 1982)	Nebyl testován
1,25(OH)₂ vitamin D₃	Snížená při deficitu	Narušená odpověď PTH na akutní změny sérového kalcia při deficitu (Ledger <i>et al.</i> , 1994)	Nebyl testován
Parathormon	Nebyla testována	Narušená u primární hyperparatyreózy (Harms <i>et al.</i> , 1994)	Vymizelý u primární hyperparatyreózy (Logue <i>et al.</i> , 1990)
Kalcitonin	Zvýšená při deficitu - testováno na zvířecích modelech (Davey <i>et al.</i> , 2008)	Nebyla testována	Nebyl testován

1.6 Parathormon v léčbě osteoporózy

Intermitentní podávání PTH jednou denně vykazuje silný anabolický efekt na kost. PTH zvyšuje kostní remodelaci, přičemž stimulace kostní novotvorby je v této a rychlejší ve srovnání se stimulací kostní resorpce. Anabolické účinky PTH léčby jsou spojeny se zvýšenou osteoblastogenezi, s oslabením apoptózy osteoblastů a osteocytů a s aktivací klidových povrchových buněk (Jilka, 2007). PTH následně zlepšuje kostní mikroarchitekturu, kvalitu a pevnost kosti (Chen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2003; Paschalis *et al.*, 2005). Přestože nově vytvořená kost je uložena i na dříve klidových plochách kosti (formace kosti založená na kostní remodelaci), v této nově vytvořené spongiózní a endokortikální kosti je založená na kostní remodelaci (Lindsay *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 2007). To je v souladu s experimentálními studiemi prokazujícími zhoršení anabolického účinku PTH u myši s deficitem osteoklastů (Demirlap *et al.*, 2002). U knock-in myši exprimujících humanizovaný RANKL, které byly léčeny denosumabem nebo alendronátem, byla velikost anabolického účinku PTH na skelet závislá na rozsahu remodelačního prostoru, který je určený po této aktivitou osteoklastů na povrchu kostí (Pieroz *et al.*, 2010). Experimentální údaje jsou v souladu s klinickými studiemi prokazujícími omezení anabolického účinku PTH u pacientů s osteoporózou léčených současně PTH a bisfosfonáty (Black *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 2010; Obermayer-Pietsch *et al.*, 2008).

V léčbě osteoporózy máme k dispozici PTH (1-84), nebo PTH (1-34). Teriparatid (rekombinantní lidský 1-34 N-terminální fragment molekuly PTH) se používá k léčbě postmenopauzální osteoporózy, osteoporózy u mužů (Neer *et al.*, 2001; Orwoll *et al.*, 2003) a u glukokortikoidy navozené osteoporózy (Lau a Adachi, 2010).

TPTD je získáván rekombinantní technologií za použití kmene *Escherichia coli*. TPTD je aplikován jedenkrát denně podkožně v dávce 20 µg. Přibližně 2 hodiny po subkutánní aplikaci 20 µg TPTD dochází k vzestupu kalcémie, vrcholu je dosaženo mezi 4. a 6. hodinou po podání TPTD. K poklesu koncentrace kalcia v séru dochází od stejné hodiny po aplikaci TPTD. Na vyloučení teriparatidu se podílí hepatální i extrahepatální clearance. Po subkutánním podání je poločas teriparatidu přibližně 1 hodina, což odráží čas nutný pro vstřebání z místa vpichu.

1.7 Chronofarmakoterapie

Chronofarmakologie je v dnešní době obor, který se zabývá ovlivněním biologických rytmů farmakoterapií a naopak vlivem biologických rytmů na farmakologickou a toxikologickou aktivitu podávaných léků. Podrobné studium biologických rytmů má význam také pro sestavování terapeutických schémat a rozbor výsledků toxikologických studií (Lemmer a Labrecque, 1987). Doba, kdy je lék podáván, může ovlivnit jeho toxicitu. Některé léky mohou naopak alterovat rytmus biochemických, fyziologických a behaviorálních procesů (Duncan, 1996). Bylo zjištěno, že prakticky všechny farmakokinetické procesy v těle vykazují cirkadiánní závislosti (Labrecque a Belanger, 1991). Účinek léku závisí na objemu krve, zásobení orgánů krví, hladinách sérových proteinů, renálních funkcích, aktivitě jater, které také vykazují změny závislé na cirkadiánní fázi. Rozšíření klasické náplně farmakokinetiky o sledování rytmických změn farmakokinetických parametrů představuje chronofarmakokinetika. Bylo prokázáno, že například v jaterních buňkách se nachází několik cirkadiánních genů (Turek a Allanda, 2002). Chronostezie shrnuje rytmické variace v citlivosti cílového biosystému (Reinberg, 1976). Tyto variace mohou být důsledkem změn v citlivosti receptorů nebo změn v intracelulárních enzymových aktivitách.

Cílem je chronofarmakoterapie je dosáhnout optimalizaci farmakoterapie správným načasováním podání léku, eliminovat alteraci fyziologických cirkadiánních rytmů (Ohdo *et al.*, 2001) a dosáhnout co možná nejvyššího omezení vedlejších nechtěných účinků při maximálním požadovaném efektu.

1.7.1 Chronofarmakoterapie osteoporózy

Navzdory jasně dokumentovaným cirkadiánním procesům v kostním metabolismu (Joseph *et al.*, 2007; el Hajj Fulehain *et al.*, 1997; Calvo *et al.*, 1991; Logue *et al.*, 1990), dosud nebylo publikováno mnoho studií zabývajících se chronofarmakoterapií osteoporózy. Suplementace vápníkem ve večerních hodinách (1000 mg kalcia v 23 hod po dobu 14 dnů) oslabila noční vzestup PTH i marker kostní resorpce (N-terminální telopeptid kolagenu I a deoxypyridinolin). Naopak ranní suplementace kalcie neměla významný vliv na celkové denní změny markerů kostní resorpce (Blumsohn *et al.*, 1994).

V studii pacientů s nedostatkem parathormonu v dospělosti vedla substituční terapie parathormonem podávaným kombinovaně s večerním podáním fosfátů (22:00 hod)

k významnému vzestupu BMD, nefrogenního cAMP a marker kostní remodelace ve srovnání lébou samotným r stovým hormonem, nebo r stovým hormonem v kombinaci s alendronátem (White *et al.*, 2011). K léčbě osteoporózy a hyperkalcémie je využíván také kalcitonin. Kalcitonin přímo inhibuje aktivitu osteoklastů (Schlemmer *et al.*, 1992). Vzhledem k tomu, že kostní resorpce vrcholí v nočních hodinách, je doporučeno podávat kalcitonin večer. V práci Schlemmera a spol. (1997) ale nebyly zjištěny rozdíly mezi ranní nebo večerní aplikací nazálního kalcitoninu na redukci CTX. Data z další studie ale naznačily, že podání perorálního kalcitoninu před večeří (v 17:00 hod) vede k efektivnější absorpci léku a k významnějšímu potlačení sérové koncentrace CTX ve srovnání s ranním (v 08:00 hod) nebo nočním (ve 22 hod) podáním perorálního kalcitoninu (Kardsal *et al.*, 2008.) Všechny tyto studie byly ale krátkodobé a nezkoumaly efekt rozdílné denní doby podání na kostní hmotu (BMD).

Bylo zjištěno, že cirkadiánní variabilita kostní resorpce je zachována také u pacientek s karcinomem prsu s kostními metastázami (Generali *et al.*, 2007). Byly studovány změny marker kostní remodelace a PTH po podávání kyseliny zolendronové buď v 11:00 hod anebo ve 23:00 hod jednou měsíčně po dobu 4 měsíců. Efekt na markery kostní remodelace byl podobný u obou skupin, ale byl zjištěn nižší vzestup PTH v séru po podání kyseliny zolendronové večer (Generali *et al.*, 2008). U pacientů s osteoporózou vliv různé denní doby podání kyseliny zolendronové nebo jiného aminobisfosfonátu na kostní remodelaci a BMD dosud nebyl studován.

Zatím nebyla publikována studie zabývající se otázkou, zdali různá denní doba podávání PTH může ovlivnit jeho účinnost na skelet. Intermitentní podávání PTH jednou denně vykazuje silný anabolický efekt na kost (Podbesek *et al.*, 1983). Na rozdíl od kontinuálního podávání nebo trvale zvýšené endogenní produkci PTH, která vyúsňuje v úbytek kostní hmoty (Mosekilde, 2008). Nabízí se zde možnost, že cirkadiánní rytmus PTH event. jeho pulzní sekrece by mohla být dlehlitá pro stimulaci kostní novotvorby. Snaha o restauraci fyziologického PTH rytmu a obnovení citlivosti kostních buněk k účinkům PTH může vytvořit novou strategii v léčbě osteoporózy (Fraser *et al.*, 2004). Účinek léků by PTH nebo jeho 1-34 N-terminálního fragmentu, teriparatidu (TPTD) na kostní remodelaci se může lišit i v závislosti na denní době jeho aplikace. Tato otázka ale zatím nebyla zkoumána a je cílem naší práce.

2 Cíle vlastní práce

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že odezva kostních buňek na léčbu teriparatidem (TPTD) závisí na denní době jeho podání.

Studie I

Cílem první studie bylo posoudit, zdali denní doba aplikace TPTD má vliv na cirkadiánní rytmus kostní remodelace a endogenního PTH a ionizovaného kalcia u pacientek s postmenopauzální osteoporózou.

Studie II

Cílem druhé studie bylo zhodnotit dlouhodobé změny kostních markerů a denzity kostního minerálu (BMD) u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených TPTD podávaným buď ráno před snídaní (~ v 8 hod) anebo po večeři (~ ve 20 hod).

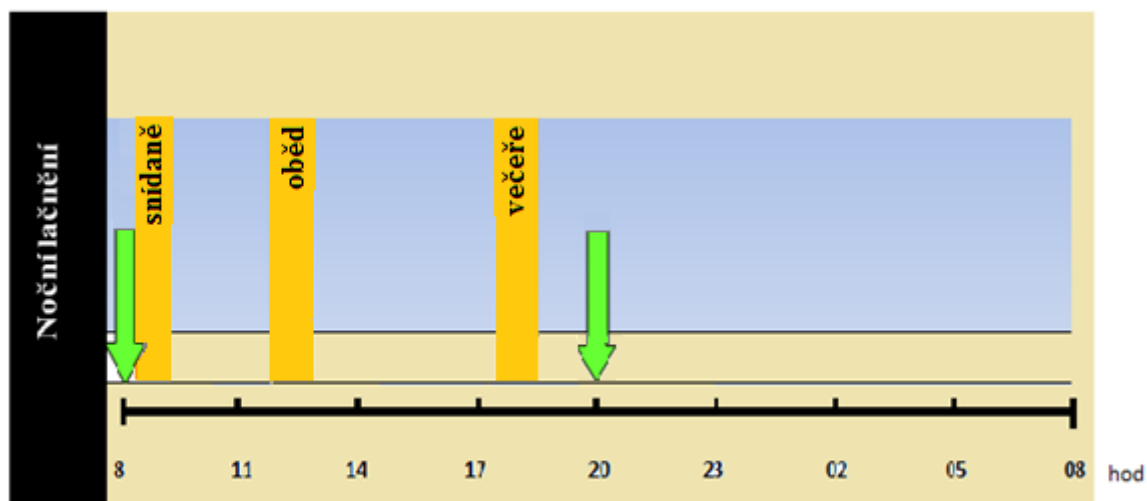
3 Metodika studií

3.1 Metody studie I

Do studie bylo zahrnuto 14 žen s postmenopauzální osteoporózou (ve věku $72,4 \pm 9,3$ let) dlouhodobě léčených TPTD v subkutánní injekci v dávce 20 µg denně (*Forsteo*®, *Eli Lilly and Co*), aplikovaného buď ráno před snídaní anebo po večeři. Do studie byly zahrnuty postmenopauzální ženy (nejméně 5 let po menopauze), u kterých byla denzitometricky diagnostikována osteoporóza (T-skóre $< -2,5$ v oblasti bederní páteře nebo krčku femuru) a zároveň byla přítomna osteoporotická zlomenina. Tyto pacientky byly léčené TPTD podávaným buď ráno před snídaní (~ v 8:00 hod) nebo po večeři (~ v 20:00 hod) za současně suplementace vitamínem D3 (v dávce 800 -1000 IU denně) a kalcíem (celkový příjem vápníku nejméně 1000 mg denně). Do studie nebyly zahrnuty pacientky s abnormální koncentrací kalcia v séru či v moči, s deficitem vitamínu D (sérové koncentrace 25-hydroxyvitamínu D < 50 nmol/l), či s jiným onemocněním (kromě osteoporózy) zasahujícím do kostního metabolismu. Dále byly vyloučeny pacientky léčené jinými léky, které ovlivňují kostní metabolismus, jako jsou glukokortikoidy, cyklosporin, fluoridy nebo thiazidová diuretika. Z dvaceti vyšetřených pacientek splňovalo kritéria pro zahrnutí do studie celkem 14 žen. Studie byla provedena po podepsání písemného souhlasu každou pacientkou, se souhlasem Etické komise 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a v souladu s právními předpisy a kodexem etických zásad pro lékařský výzkum na ústí lidských subjektů dle světové lékařské asociace (Helsinské deklarace). Základní charakteristika pacientek je shrnuta v tabulce 2.

Den před zahájením studie pacientky pokračovaly v léčbě TPTD, vápníkem a vitamínem D a noc před začátkem studie lžily. V den studie byla podávána standardizovaná strava v úse od 8:00 do 8:30 hod, 11:30 do 12:00 hod a 17:30 do 18:00 hod, byl vymezen také příjem tekutin. Doba spánku a bdění nebyla porušena. TPTD byl podáván buď ráno (~ v 8:00 hod, před snídaní) nebo večer (~ v 20:00 hod, po večeři). V 08:00 hod (před podáním TPTD) byla pacientkám zavedena intravenózní kanylka a následně byl proveden 1. odběr krve. V průběhu dalších 24 hodin byly odebrány krevní vzorky (sérum a plazma) v intervalu 3 hodin. Protokol studie je znázorněn na obr. 3.

Obrázek . 3 Protokol studie I



Typicky znázorňuje dobu podání teriparatidu: ranní aplikace (~ v 8:00 hod, před snídaní) nebo večerní aplikace (~ v 20:00 hod, po večeři). Na ose x jsou znázorněny časové intervaly odběru krve. Podání stravy probíhalo od 8:00 do 8:30 hod (snídaně), od 11:30 do 12:00 hod (oběd) a od 17:30 do 18:00 hod (večeře).

Biochemická analýza

Vzorky plazmy a séra byly skladovány při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Měření ionizovaného kalcia (iCa) v séru bylo provedeno ve stejný den po anaerobním odběru všech vzorků, které byly anaerobně skladovány v teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se zabránilo změně pH. Všechny vzorky, kromě ionizovaného vápníku, byly analyzovány současně. Koncentrace iCa byla měřena pomocí iontové selektivní elektrody s AVL 9180 (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Plazmatické koncentrace imunoreaktivního intaktního parathormonu (PTH) a sérové koncentrace CTX byly měřeny pomocí elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (analyzátor Elecsys 1010, Roche Diagnostics, Německo). Sérové koncentrace PINP byly stanoveny radioimunoanalýzou (Procollagen Intact PINP, Orion Diagnostica, Finsko). Sérové koncentrace 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) byly stanoveny pomocí enzymatické imunoanalýzy (OCTEIA-25-Hydroxy Vitamin D, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Velká Británie). Koncentrace 25-OHD nad 50 nmol/l byly považovány za normální.

Statistická analýza

K posouzení 24 hodinových cyklických změn měřených veličin byl použit lineární model s opakovaným měřením (GLM RM, General Linear Model Repeated Measured Variant). Cirkadiální rytmus byl prokázán v případě, že model odhalil buď existenci charakteristické křivky popisující denní rytmus, která byla podobná u všech pacientů (vliv času) nebo existenci dvou křivek v rámci každé skupiny, které byly navzájem významně podobné. GLM RM jsme kromě testování významnosti zaznamenaných hodnot vybraných proměnných (čas, skupina, interakce mezi časem a skupinou) uřídili rovněž pro porovnání měřených parametrů v rámci jedné skupiny a také pro odhad podílu variability, a tím zhodnocení velikosti účinku (size effect) této závislosti (η^2). Cohenova konvence označuje silný vliv při $\eta^2 > 0,137$, středně silný vliv při $0,137 > \eta^2 > 0,0588$ a slabý vliv při $0,0588 > \eta^2 > 0,0099$. Použitím Pearsonova korelačního koeficientu byl zkoumán vztah mezi změnami v úrovni hladiny CTX nebo iCa a PTH mezi jednotlivými odběry (rozdíl 3 hodin). Jako alternativu k GLM RM jsme uřídili Cosinor model. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí programu SPSS, software pro Windows, verze 16.0. (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Tabulka .2 Vstupní charakteristika pacient studie I

	ranní TPTD	ve erní TPTD	p
Počet pacient	7	7	-
Věk (roky)	69,7 ± 9,2	75,1 ± 9,1	ns
Váha (kg)	68,6 ± 7,0	53,9 ± 4,1	0,004
Výška (m)	1,65 ± 0,06	1,53 ± 0,06	0,006
BMI (kg/m ²)	25,6 ± 2,6	23,0 ± 1,1	ns
BMD bederní páte (T-score)	-3,2 ± 0,7	-3,1 ± 0,8	ns
BMD celkový proximální femur (T-score)	-2,1 ± 0,9	-2,4 ± 0,7	ns
Doba léčby TPTD (měsíce)	9,4 ± 1,8	11,9 ± 2,3	ns
S-iCa (mmol/l)	1,29 ± 0,05	1,31 ± 0,05	ns
P-PTH (ng/l)	28,9 ± 7,4	25,8 ± 11,3	ns
S-CTX (ng/l)	662,5 ± 168	940,1 ± 461	ns
S-PINP (μg/l)	118,3 ± 39	169,9 ± 92	ns

Data jsou uvedena v průměrných hodnotách ± SD.

Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány nepárovým t-testem.

Zkratky: p: hladina významnosti; ns: nesignifikantní rozdíl mezi skupinami;

TPTD: Teriparatid (rekombinantní lidský N-terminální fragment molekuly parathormonu,

PTH 1-34); BMI: body mass index; BMD: bone mineral density (densita kostního minerálu);

S-iCa: ionizované kalcium v séru; P-PTH: plazmatický intaktní PTH; S-CTX: C-terminální

telopeptid kolagenu typu I v séru; S-PINP: N-terminální propeptid prokolagenu typu I v séru

3.2 Metody studie II

Do studie byly zařazeny ambulantní pacientky s prokázanou postmenopauzální osteoporózou ve věku 60 až 85 let, které byly léčeny v Osteocentru III. interní kliniky v Praze od ledna 2007 do prosince 2009. Vstupní kritéria splňovaly postmenopauzální ženy s alespoň jednou osteoporotickou zlomeninou obratle a denzitometrickým nálezem s T-skóre $< -2,9$ v oblasti celkového proximálního femuru nebo krčnímu femuru. Do studie nebyly zařazeny pacientky s koncentrací 25-hydroxyvitaminu D v séru pod 50 nmol/l, abnormální koncentrací kalcia v séru i v moči nebo pacientky s jiným chronickým onemocněním ovlivňujícím kostní metabolismus. Do studie rovněž nebyly zařazeny pacientky, které užívaly léky, které zasahují do kostního metabolismu jako raloxifen, stroncium-ranelát, kortikosteroidy, cyklosporin, fluoridy nebo thiazidové diuretika, v posledních 12 měsících před začleněním do studie. V případě perorální i parenterální léčby bisfosfonáty nesměly být pacientky léčeny minimálně 3 roky před zahájením studie.

Do studie bylo randomizováno celkem 52 pacientek, které splňovaly vyšetřovací kritéria. Za začlenění do studie bylo podmíněno podepsáním informovaného souhlasu. Studie byla schválena etickou komisí VFN v Praze, a je v souladu s právními předpisy a etickými zásadami pro lékařský výzkum za účasti lidských subjektů podle světové lékařské asociace (Helsinské deklarace).

Základní charakteristika pacientek je shrnuta v tabulce 3. Pacientky byly léčeny TPTD v subkutánní injekci v dávce 20 mg denně (*Forsteo*®, *Eli Lilly and Co.*). Pacientky byly randomizovány do dvou léčebných skupin. První skupinu tvořily pacientky, které si aplikovaly TPTD v ranních hodinách (~ v 08:00 hod., před snídaní), v druhé skupině byl TPTD podáván po večeři (~ ve 20:00 hod.). Dodržování dávkování a denní doby aplikace TPTD bylo hodnoceno každé 3 měsíce, kdy byla kontrolována také náplň vrácených injekčních per. Pacientky byly opakovaně poučeny o způsobu injekční aplikace TPTD a dotazovány na problémy spojené s podáváním léku, dobou aplikace i vynecháním dávky léku. Všechny pacientky měly celkový denní příjem vápníku nejméně 1000 mg, a to buď prostřednictvím potravy nebo stravy obohacené o doplňky uhličitanu vápenatého (500 mg elementárního kalcia dvakrát denně, po snídani a po večeři). Dvě pacientky v ranní skupině odmítly pravidelně užívat kalciové doplňky z důvodu gastrointestinální intolerance, proto jim byl doporučen odpovídající příjem mléčných výrobků. Po celou dobu léčby byla podávána suplementace vitaminem D3 v dávce 800 - 1000 IU denně.

Přivstupní, 6 a 12- měsíční kontrole bylo provedeno kontrolní měření BMD a odběr krve pro předchozí monitoring. Následně byla provedena laboratorní analýza (markery kostní remodelace, kalcemie a rutinní biochemické vyšetření krve a moče).

Biochemická analýza

Rutinní biochemické analýzy byly provedeny s prvními vzorky, další porovnávací části séra a plazmy byly uloženy afl do analýzy při teplotě -70°C .

Sérové koncentrace C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (CTX) a intaktního PTH byly měřeny pomocí elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (Analyzátor Cobas, Roche Diagnostics, Německo).

Sérové koncentrace 5b izoformy tartarát rezistentní kyselé fosfatázy (TRAP 5b) byly měřeny enzymatickou imunanalýzou (Bone TRAP Assay, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Velká Británie).

Sérová koncentrace intaktního N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) byla měřena radioimunoesejí (Procollagen Intact PINP, Orion Diagnostica, Espo, Finsko).

Normální hodnoty biochemických markerů kostní remodelace v naší laboratoři byly následující: sérum PINP 19,3-56,4 $\mu\text{g/l}$; sérum CTX 156-458 ng/l a sérová TRAP 5b 1/01-9/03 U/l.

Sérové koncentrace celkového kalcia, kreatininu a fosfátů v séru byly měřeny pomocí automatického analyzátoru (Modular, Roche Diagnostics, Německo). Sérové koncentrace 25-hydroxyvitaminu D (25-OHD) byly stanoveny při zahájení léčby pomocí enzymatické imunoanalýzy (OCTEIA-25-Hydroxy Vitamin D, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Velká Británie). Koncentrace 25-OHD nad 50 nmol/l byly považovány za normální.

Měření kostní denzitometrie

Denzita kostního minerálu (BMD) byla měřena před zahájením léčby TPTD, dále po 6 a 12 měsících léčby TPTD pomocí dvouenergievé rentgenové absorpciometrie (DXA; denzitometr QDR 4500, Hologic Inc, Waltham, MA, USA, software v. APEX 3,0).

Krátkodobá přesnost měření in vivo bederní páteře (L1-L4), celkového proximálního femuru, krčku femuru a distální 1/3 radii byla 0,7%, 0,9%, 1,9% a 2,0%. Dlouhodobá přesnost měření in vitro byla 0,31%.

Statistická analýza

V obou léčebných skupinách pacientů byly vyhodnoceny demografické údaje pacientů a výchozí průměrné vstupní hodnoty BMD a měřených biochemických markerů (průměr ± 1 SD). Pro statistickou analýzu byly použity absolutní hodnoty biochemických parametrů a BMD a rovněž procentuální změny BMD oproti výchozím hodnotám.

Srovnání dat v rámci jednotlivých skupin a mezi skupinami bylo provedeno pomocí GLM-RM. GLM-RM jsme použili rovněž pro odhad podílu vysvětlené variability, a tím i velikosti úinku této závislosti (η^2). Cohenova konvence označuje silný vliv při $\eta^2 > 0,137$, střední silný vliv při $0,137 > \eta^2 > 0,0588$ a slabý vliv při $0,0588 > \eta^2 > 0,0099$.

Kromě toho byl použit Mann-Whitney test k testování rozdílů mezi skupinami. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí programu SPSS pro Windows, verze 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Tabulka . 3 Vstupní charakteristika pacient studie II

	ranní TPTD	ve erní TPTD	p
Po et pacient	26	24	
V k (roky)	72 ± 5,1	73 ± 9	ns
Roky po menopauze	26,5 ± 6,8	23,4 ± 6,4	ns
V ý-ka (m)	1,59 ± 0,06	1,53 ± 8	ns
V áha (kg)	61,2 ± 8	58,8 ± 9	ns
BMI (kg/m ²)	24,2 ± 3	25,2 ± 3,8	ns
BMD bederní páte (g/cm ²)	0,652 ± 0,08	0,723 ± 0,15	ns
BMD celkový proximální femur	0,639 ± 0,09	0,608 ± 0,09	ns
BMD kr ek femuru	0,487 ± 0,07	0,513 ± 0,07	ns
BMD 1/3 radia	0,497 ± 0,06	0,495 ± 0,06	ns
Po et pacient s prevalentní zlomeninou:			
obratel	26	24	ns
kr ek femuru	1	2	ns
humerus	3	1	ns
záp stí	8	7	ns
jiná nízkozát flová zlomenina	6	7	ns

Data jsou uvedena v pr m rných hodnotách ± SD

Zkratky: p: hladina významnosti; ns: nesignifikantní rozdíl mezi skupinami;

BMI: body mass index; BMD: bone mineral density density (denzita kostního minerálu);

TPTD: Teriparatid (rekombinantní lidský N-terminální fragment molekuly parathormonu, PTH 1-34)

4 Výsledky

4.1 Výsledky studie I

Analýza změn sérové koncentrace CTX ukázala významný vliv denní doby na naměřené hodnoty (našas $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,492$, velmi silný účinek podle konvence Cohena). Tyto výsledky naznačují, že hodnoty CTX tvoří charakteristickou křivku, která je vlastní v-ém pacientům sledovaných skupin a vysvětluje 49,2% interindividuální variability měřených hodnot CTX. Další analýzy ukázaly ještě silnější model, který charakterizují dvě křivky pro každou skupinu zvlášť (interakce času vs. skupiny, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,496$). Ve skupině pacientů léčených TPTD aplikovaným ~ ve 20:00 hod sledovaly sérové koncentrace CTX cirkadiální rytmus, zatímco ve skupině pacientů léčených TPTD aplikovaným ráno křivka ukázala spíše cirkasemiální rytmus (Graf 1, B). Rozdíl průměrných koncentrací CTX za 24 hodin mezi oběma skupinami nebyl významný ($p = 0,098$), ale síla testu byla nízká (observed power = 0,379). Analýza průměrné hodnoty křivky po 12 hodinách ukázala významný výděl denní průměrnou hodnotu sérového CTX (mezi 20:00 - 08:00) ve večerní skupině, ve srovnání s ranní skupinou ($p = 0,033$, $\eta^2 = 0,326$), (Graf 1A, 1B).

GLM-RM neprokázala vliv denní doby na naměřené hodnoty sérového PINP u jednotlivých skupin ($p = 0,298$). Analýza vycházející ze dvou křivek z každé skupiny zvlášť prokázala významné odlišné rytmy PINP (interakce času a skupiny, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,248$), ovšem s mnohem menší amplitudou než u markeru kostní resorpce (Graf 2A, 2B; Tabulka 4). Nebyly zjištěny rozdíly v 24 h průměrných hodnotách mezi ranní a večerní TPTD skupinou, pravděpodobně vzhledem k velké interindividuální variabilitě sérové koncentrace PINP.

Analýza změn ionizovaného kalcia prokázala významný vliv času ($p = 0,021$), interakce času a skupiny ($p < 0,001$) a velmi silný účinek podle konvence Cohena (vliv času $\eta^2 = 0,180$, interakce času a skupiny $\eta^2 = 0,423$). Křivky obou skupin měly protichůdný průběh (tj. vysoká hodnota v ranní skupině se objevila v době nízkých hodnot u večerní skupiny a naopak (Graf 3A, 3B) a společná křivka vysvětluje tedy pouze 18,0% interindividuální variability naměřených hodnot ionizovaného kalcia v séru. Analýza v každé skupině zvlášť vysvětlovala 42,3% variability. Rozdíl ve 24 hodinové průměrné koncentraci mezi oběma skupinami byl nevýznamný ($p = 0,973$), avšak síly testu byly extrémně nízké (0,050). Také subanalýza křivky po dobu 12 hodin po podání TPTD nevykázala žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami, pravděpodobně kvůli vysoké interindividuální variabilitě. Sérové koncentrace iCa však měly jasnou souvislost s kostní resorpcí a bylo hodnoceno podle sérových

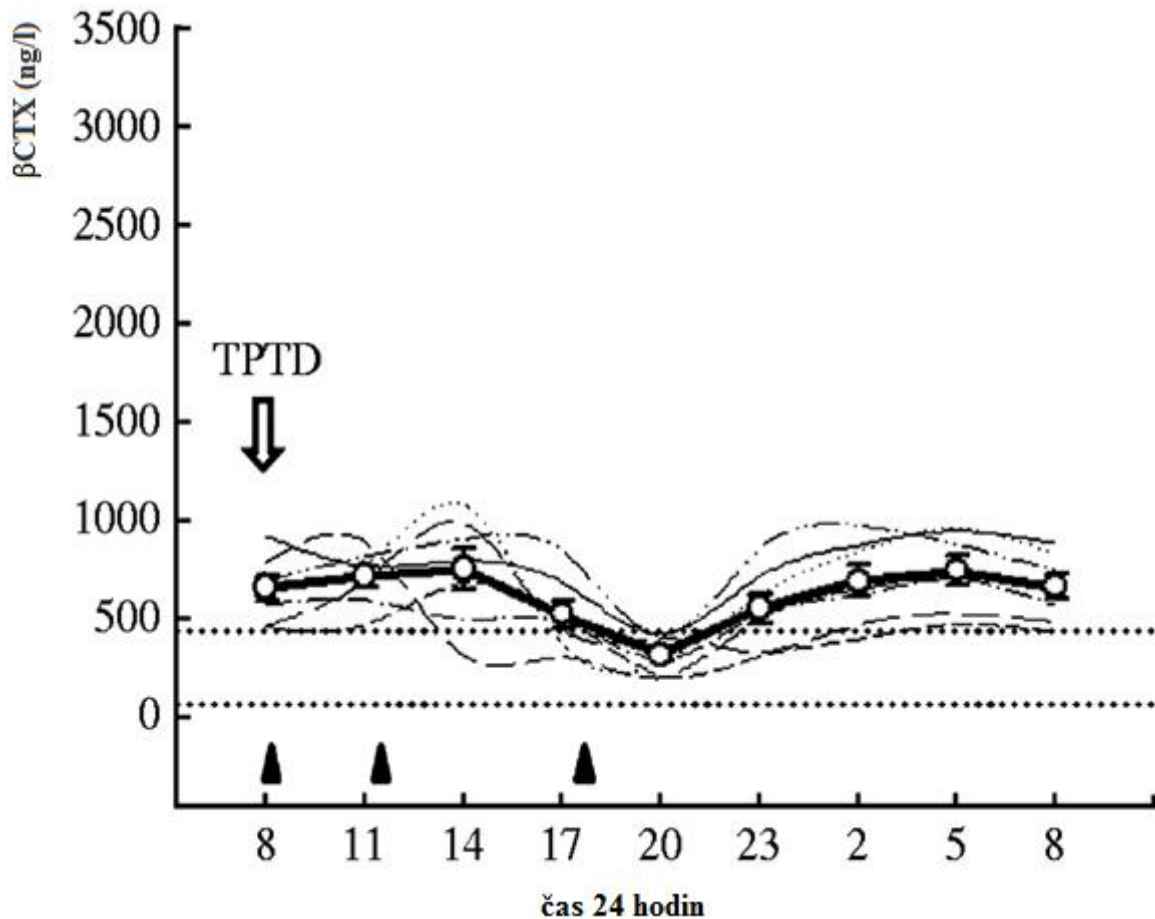
koncentrací CTX ($p < 0,001$).

Analýza variability endogenního plazmatického PTH prokázala jak významný vliv času ($p = 0,038$), tak interakce času a skupiny ($p < 0,001$), tedy velmi silný účinek podle konvence Cohena: vliv času $\eta^2 = 0,152$, interakce času a skupiny $\eta^2 = 0,283$. Endogenní PTH odrážel změny sérového iCa v opačném směru (Graf 3A, 3B). Významná negativní korelace byla nalezena mezi změnami iCa a PTH ($p < 0,001$). Průměrné denní hodnoty PTH se nelišily mezi skupinami ($p = 0,572$), ale síla testu byla extrémně nízká (0,083).

Výsledky Cosinor analýzy jsou uvedeny v tabulce 4. Jedním z předpokladů pro užití Cosinor analýzy je požadavek, aby denní maximální a minimální hodnoty byly v protikladu (tedy posunuté o 12 hod), což je v ostrém kontrastu s vztahy naměřených dat. Proto tato data nelze použít pro odhad fáze a odhadovaný čas pro maximum a minimum na rozdíl od výpočtu MESOR a amplitudy, kde posun maxim a minim nemá žádný vliv. Všechna srovnání mezi skupinami pro MESOR a amplitudu nevykázaly žádné významné rozdíly, kromě amplitudy pro S-CTX ($p < 0,05$), kde byl zaznamenán významný rozdíl mezi skupinami.

Graf 1A

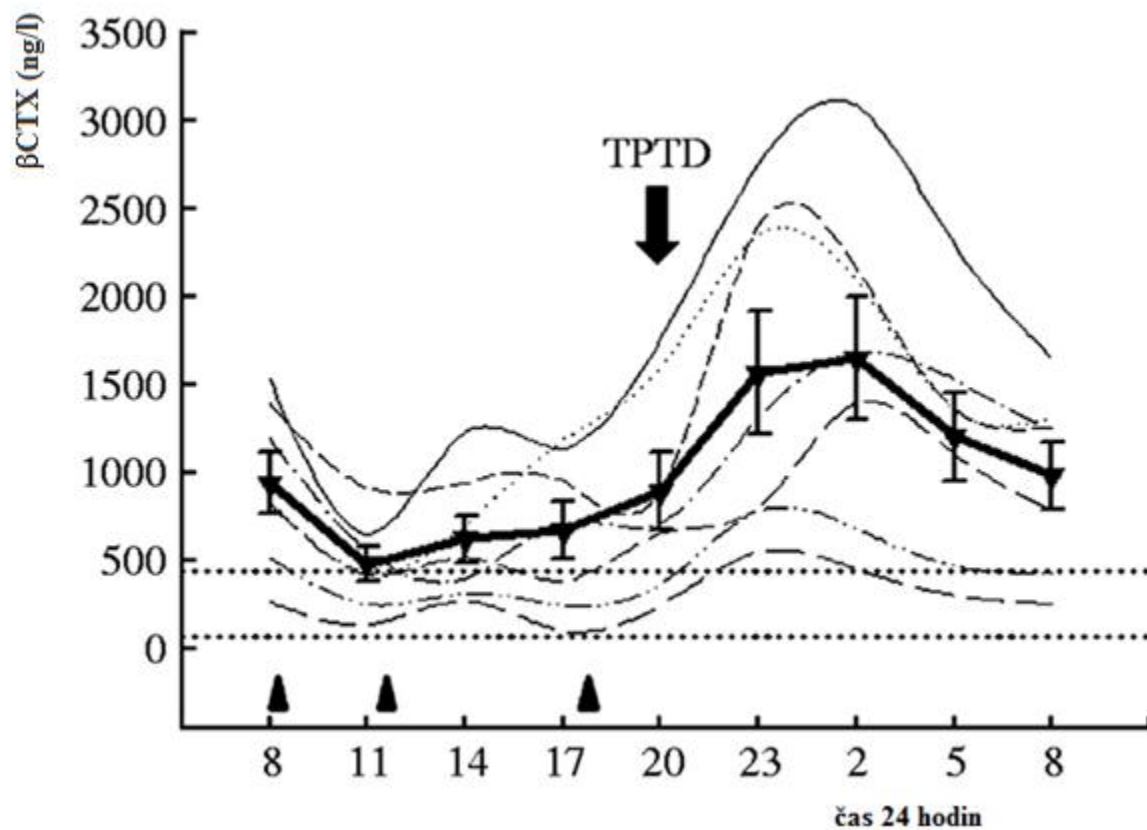
Změny sérové koncentrace C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (CTX) po ranní aplikaci teriparatidu (TPTD)



Každá křivka představuje hodnoty CTX jedné individuální pacientky. Silně zvýrazněná plná křivka představuje průměrné hodnoty \pm S.E.M. Tečkované úsečky představují rozmezí normálních referenčních hodnot CTX. Čas podání TPTD je označen šipkou. Čas podávání stravy je označen trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Graf 1B

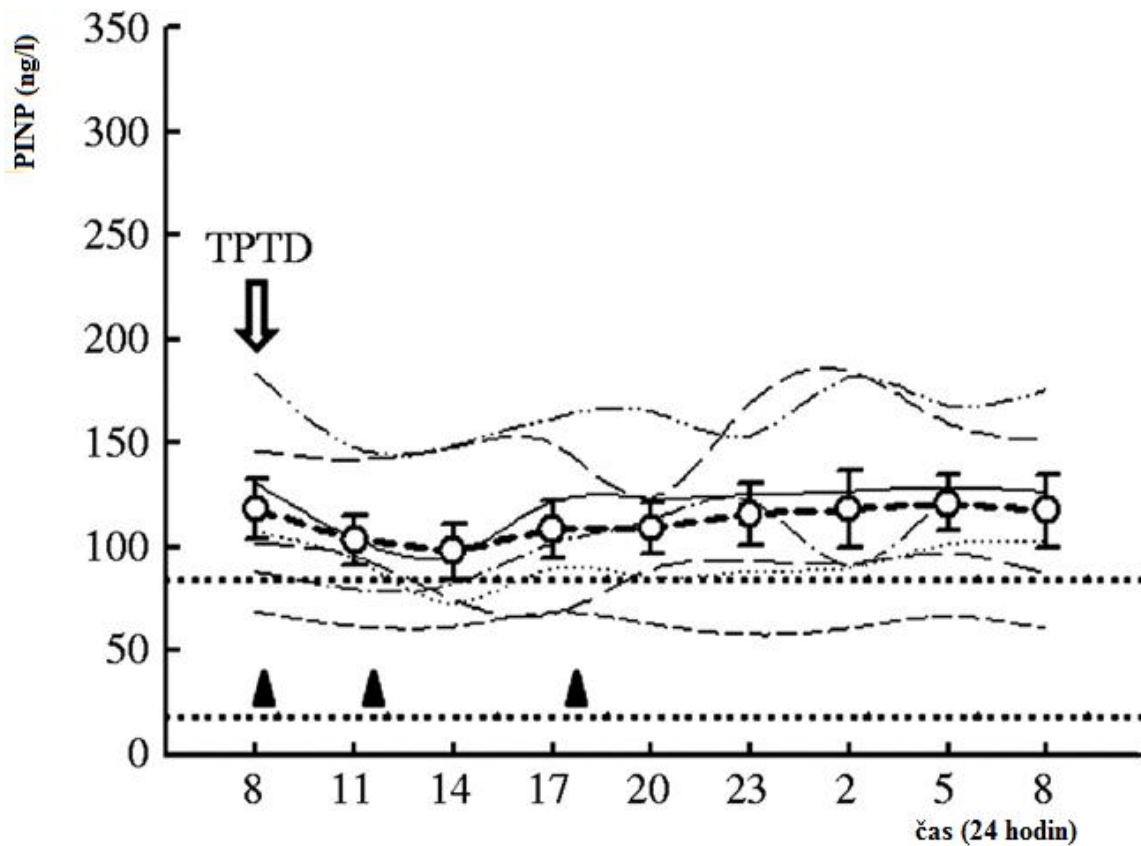
Změny sérové koncentrace C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (CTX) po venózní aplikaci teriparatidu (TPTD)



Každá křivka představuje hodnoty CTX jedné individuální pacientky. Silně zvýrazněná plná křivka představuje průměrné hodnoty \pm S.E.M. Tečkované úsečky představují rozmezí normálních referenčních hodnot CTX. Čas podání TPTD je označen šipkou. Čas podávání stravy je označen trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Graf 2A

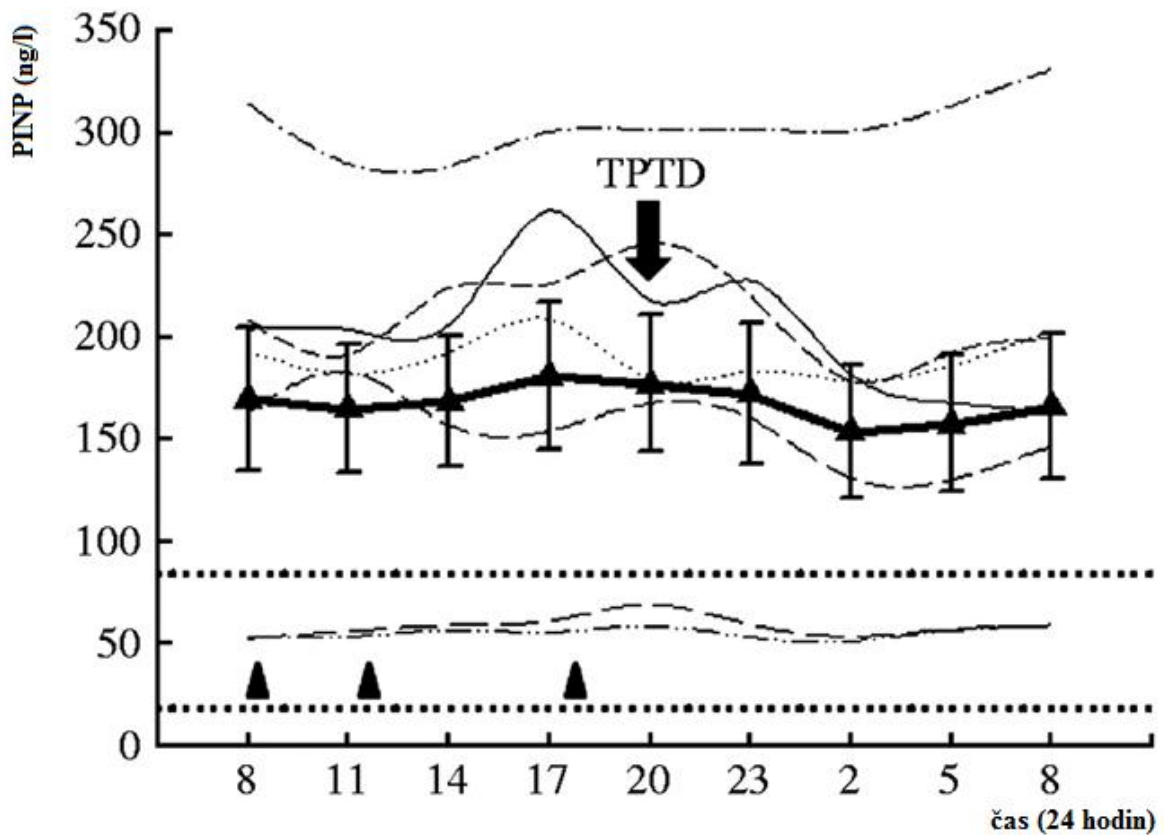
Změny sérové koncentrace N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) po ranní aplikaci teriparatidu (TPTD).



Každá křivka představuje hodnoty PINP jedné individuální pacientky. Silně zvýrazněná kruhová křivka představuje průměrné hodnoty \pm S.E.M. Tečkované úsečky představují rozmezí normálních referenčních hodnot PINP. Čas podání TPTD je označen šipkou. Časy podávání stravy je označeno trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Graf 2B

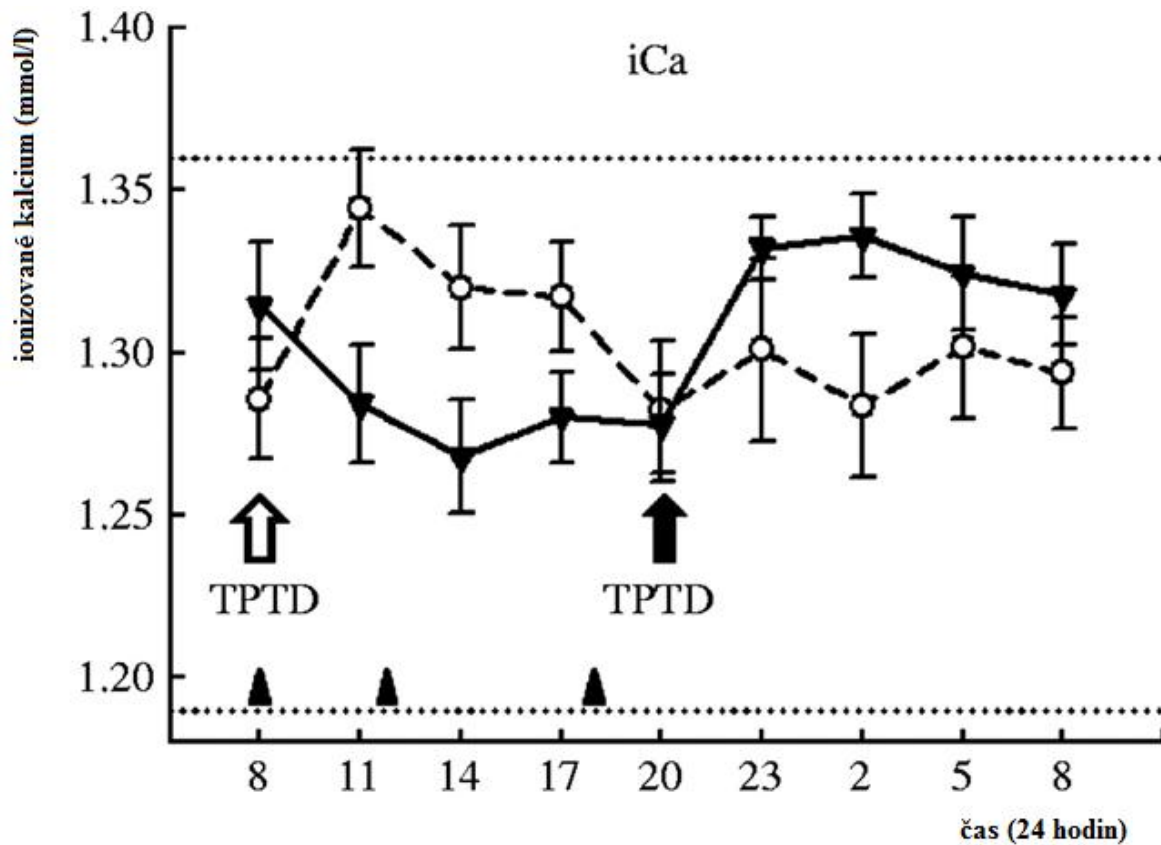
Změny sérové koncentrace N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) po perorální aplikaci teriparatidu (TPTD)



Každá křivka představuje hodnoty PINP jedné individuální pacientky. Silně zvýrazněná plná křivka představuje průměrné hodnoty \pm S.E.M. Tečkované úsečky představují rozmezí normálních referenčních hodnot PINP. Čas podání TPTD je označen šipkou. Čas podávání stravy je označen trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Graf 3A

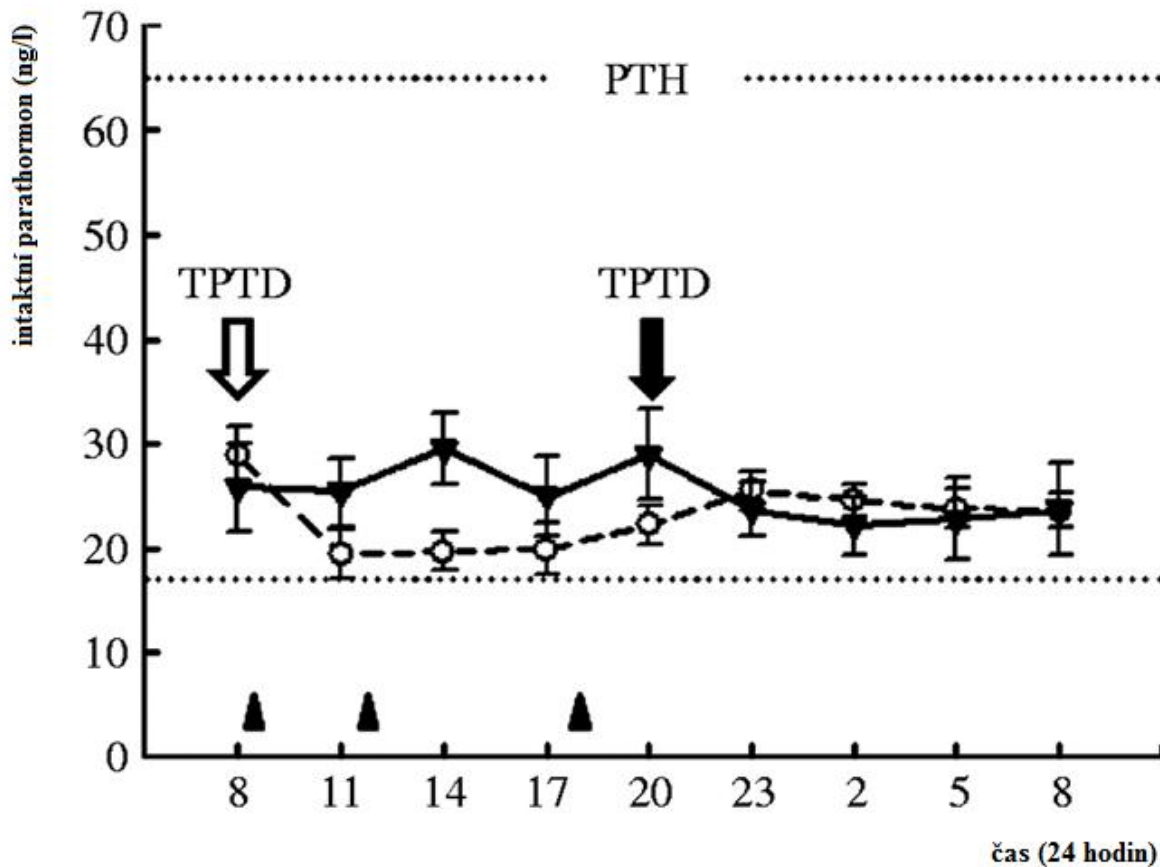
Průměrné změny \pm S.E.M. ionizovaného vápníku (iCa) v séru buď po ranní (přerušovaná čára) nebo ve večerní (plná čára) aplikaci teriparatidu (TPTD)



Televizní úseky představují rozmezí normálních referenčních hodnot PTH. Čas podání TPTD je označen šipkou. Čas podávání stravy je označen trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Graf 3B

Průměrné změny \pm S.E.M. plazmatické koncentrace intaktního parathormonu (PTH) buď po ranní (pěru-ovaná křivka) nebo večerní (plná křivka) aplikaci teriparatidu (TPTD)



Tečkované úsečky představují rozmezí normálních referenčních hodnot PTH. Úsečky podání TPTD je označeno šipkou. Úsečky podávání stravy je označeno trojúhelníky (08:00-08:30 hod, 11:30-12:00 hod a 17:30-18:00 hod).

Tabulka . 4 Analýza cirkadiánních rytm (Cosinor model)

	MESOR	Amplituda	Fáze (as)	Max (odhad)	Min (odhad)
S- CTX_ranní	585,7	157,8	-0,2	7,8	19,8
S- CTX_ve erní	990,9	522,7*	-6,7	1,3	13,3
S-iCa_ranní	1,3	0,02	5,6	13,6	1,6
S-iCa_ve erní	1,3	0,04	-5,2	2,8	14,8
S-PINP_ranní	111,9	10,5	-5,0	3,0	15,0
S-PINP_ve erní	168,3	9,1	9,0	17,0	5,0
P-PTH_ranní	22,6	2,8	-5,4	2,6	14,6
P-PTH_ve erní	25,2	2,9	7,2	15,2	3,2

V-echna srovnání mezi skupinami pro MESOR a amplitudou neukázaly fládné podstatné rozdíly, krom amplitudy S- CTX * P < 0,05

Zkratky:

MESOR: (Midline Estimate Statistic of Rhythm); Max: maximum; Min: minimum; S-iCa: ionizované kalcium v séru; P-PTH: plazmatický intaktní parathormon; S- CTX: C-terminální telopeptid kolagenu typu I v séru; S-PINP: N-terminální propeptid prokolagenu typu I v séru

4.2 Výsledky studie II

Do studie bylo zahrnuto celkem 52 pacientek. Dvě pacientky ve veškeré skupině přerušily léčbu před 6 měsíci léčby (jedna z osobních důvodů, druhá z důvodu hypertyreózy způsobené polyendokrinní toxickou strumou, která nesouvisela s léčbou TPTD). Veškeré ostatní pacientky dokončily 12-měsíční studii. Charakteristiky jednotlivých pacientek a výchozí hodnoty měřených parametrů jsou uvedeny v tabulce 3 a 5. Obě léčebné skupiny byly na začátku léčby podobné. Léčba TPTD byla dobře tolerována u obou léčebných skupin, nebyly zaznamenány žádné změny denní doby podání léčby. Compliance k léčbě byla > než 85% v obou léčebných skupinách.

Denzita kostního minerálu (BMD)

Když byly hodnoceny obě léčebné skupiny společně, léčba TPTD vedla k signifikantnímu zvýšení BMD v oblasti bederní páteře (GLM-RM, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,549$). V oblasti celkového proximálního femuru a krčku femuru nebyly zjištěny významné změny BMD, zatímco BMD v oblasti distálního radia významně klesla (GLM-RM, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,274$). V raní skupině pacientů došlo k významnému vztupnému nárůstu BMD v oblasti bederní páteře ve srovnání s veškerou skupinou ($p < 0,05$), (Graf 4A). Dále byl zjištěn významný rozdíl ve směrnicích křivek vyjadřujících změnu BMD v oblasti bederní páteře mezi léčebnými skupinami (GLM-RM, efekt v rámci skupiny, $p = 0,029$, $\eta^2 = 0,081$), stejně jako rozdíl profilů křivek (GLM-RM, lineární kontrast v rámci skupiny, $p = 0,018$; $\eta^2 = 0,126$). Změny BMD v ostatních měřených oblastech zájmu (Graf 4B, 4C) se mezi skupinami významně nelišily, byl však naznačen trend k vztupnému zvýšení BMD v oblasti celkového proximálního femuru v raní léčebné skupině (Graf 4B).

Biochemické markery kostní remodelace

Když byly hodnoceny obě léčebné skupiny společně, 6 měsíční léčba TPTD vedla k významnému zvýšení sérové koncentrace CTX (GLM-RM, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,504$), sérové koncentrace TRAP 5b (GLM-RM, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,372$) a sérové koncentrace PINP (GLM-RM, $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,549$). Charakteristický práh křivky pro příslušné kostní markery, který je vlastní v obou léčebných skupinách, vysvětluje velkou část interindividuální variability měřených kostních markerů (50,4%, 37,2% a 54,9% pro CTX, TRAP 5b a PINP, v tomto pořadí). Nebyly zjištěny významné rozdíly ve směrnicích křivek mezi léčebnými skupinami (GLM-RM, efekt v rámci skupiny: $p = 0,948$, $p = 0,119$ a $p = 0,061$ pro CTX, TRAP 5b a

PINP, v tomto po adí). Při hodnocení rozdílů mezi profily kivek (GLM-RM, lineární kontrast v rámci skupiny), sérová koncentrace PINP a TRAP 5b ve ve erní lé ebné skupin ukázala významn v t-í nár st b hem prvních 6 m síc lé by TPTD ve srovnání s ranní lé ebnou skupinou (GLM-RM, pro PINP $p = 0,041$; $\eta^2 = 0,058$ a pro TRAP 5b $p = 0,040$; $\eta^2 = 0,115$), (Graf 5B, 5C). Po 12 m sících lé by TPTD nebyly prokazatelné rozdíly v sérové koncentraci PINP mezi lé ebnými skupinami (Graf 5C). Naopak, sérová koncentrace TRAP 5b měla tendenci být vyšší b hem 12 m síc lé by TPTD ve ve erní lé ebné skupin ve srovnání s ranní skupinou. Nebyl pozorován fládný významný rozdíl v sérové koncentraci CTX mezi ob ma lé ebnými skupinami (Graf 5A).

Vápník a fosfor

Při hodnocení obou lé ebných skupin pacientek jak společn , tak samostatn , nebyly pozorovány fládné signifikantní zm ny sérové koncentraci kalcia a fosforu. Hyperkalcémie nebyla pozorována u fládné pacientky. Nicmén , dal-í analýza kivek koncentrace sérového kalcia ukázala významný rozdíl ve sm rnici kivek mezi lé ebnými skupinami (GLM-RM, efekt v rámci skupiny, $p = 0,014$; $\eta^2 = 0,097$), což nazna uje trend k vyšším koncentracím sérového kalcia u pacientek v ranní lé ebné skupin ve srovnání s ve erní skupinou.

Tabulka . 5 Bazální hodnoty biochemických parametr

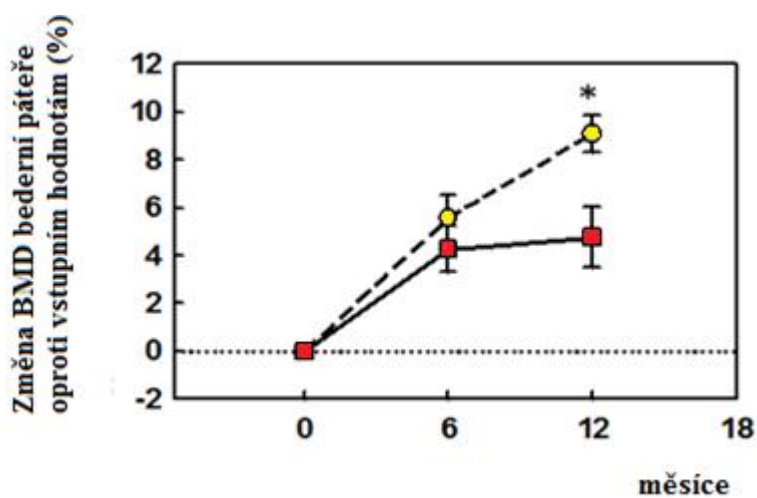
Hodnota	Ranní skupina	Ve erní skupina	p
S- CTX (ng/l)	413 ±187	429 ±176	ns
S-TRAP 5b (IU/l)	3.5 ± 1.1	3.4 ± 1.1	ns
S- PINP (µg/l)	52 ± 23	53 ± 19	ns
S-Ca (mmol/l)	2.40 ± 0.09	2.37 ± 0.1	ns
S- fosfát (mmol/l)	1.12 ± 0.18	1.14 ± 0.16	ns
P- iPTH (pmol/l)	3.5 ± 1.5	3.2 ± 1,6	ns
S- 25-hydroxyvitamin D (ng/ml)	28.5 ± 5.2	28.4 ± 5.5	ns

Data jsou uvedena v průměrných hodnotách ± SD.

Zkratky: p: hladina významnosti; ns: nesignifikantní rozdíl mezi skupinami; S- CTX (ng/l): C-terminální telopeptid kolagenu typu I v séru; S-TRAP 5b (IU/l): tartarát rezistentní kyselá fosfatáza isoenzym5b v séru; S-PINP (µg/l): N- terminální propeptid prokolagenu typu I v séru; S-Ca (mmol/l): kalcium v séru; S- fosfát (mmol/l): fosfát v séru; P-PTH (ng/l): plazmatický intaktní parathormon; S- 25-hydroxyvitamin D (ng/ml): 25 - hydroxyvitamin D v séru

Graf 4A

Průměrné změny BMD (průměr ± SEM) v oblasti bederní páteře u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teriparatidem (TPTD)

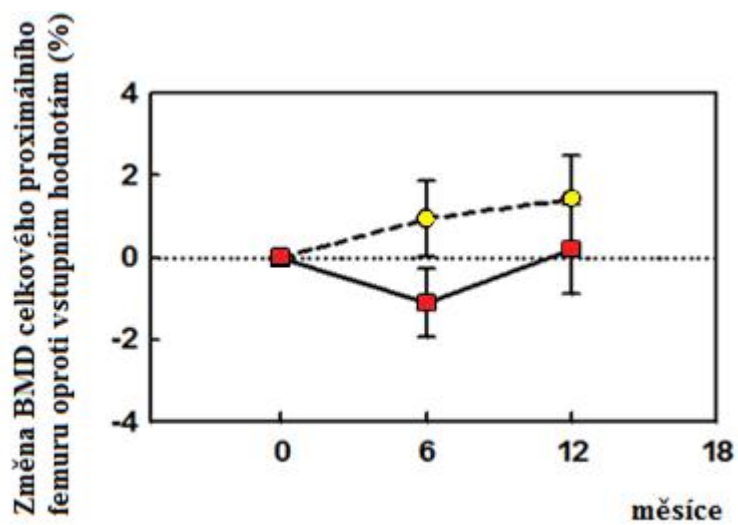


Změny BMD ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny žlutými kruhy (●), ve večerních hodinách plnou čarou (■).

* je označen statisticky významný rozdíl ve změnách mezi léčebnými skupinami ($p < 0,05$).

Graf 4B

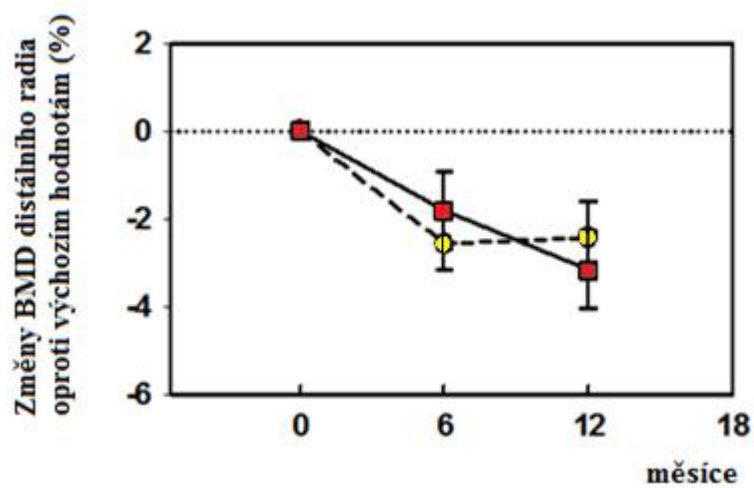
Průměrné změny BMD (průměr \pm SEM) v oblasti celkového proximálního femuru u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teriparatidem (TPTD)



Změny BMD ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny žlutými kruhy (●), ve večerních hodinách plnou čarou (■).

Graf 4C

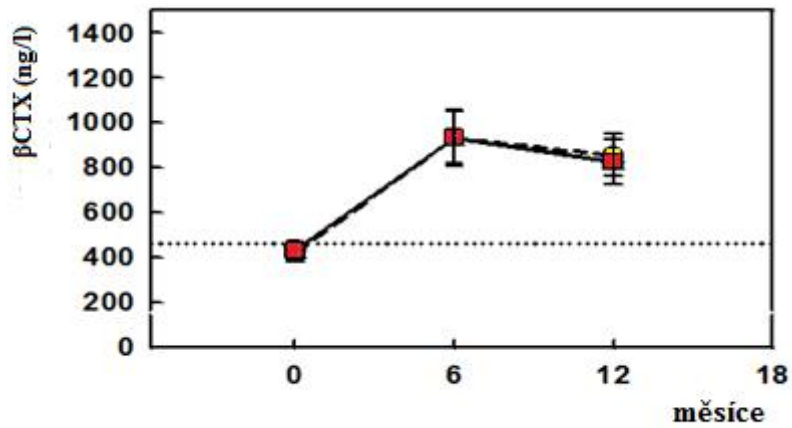
Průměrné změny BMD (průměr \pm SEM) v oblasti distálního radia u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teriparatidem (TPTD)



Změny BMD ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny žlutými kruhy (●), ve večerních hodinách plnou čarou (■).

Graf 5A

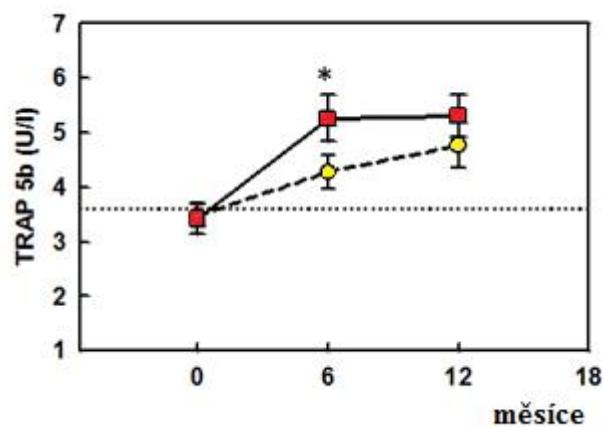
Průměrné změny (průměr \pm SEM) C terminálního telopeptidu kolagenu typu I (β CTX) v séru u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teripartidem (TPTD)



Změny β CTX ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny žlutým čtverečkem (■), ve večerních hodinách plnou červenou (■).

Graf 5B

Průměrné změny (průměr \pm SEM) tartarát rezistentní kyselé fosfatázy 5b (TRAP 5b) v séru u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teripartidem (TPTD)

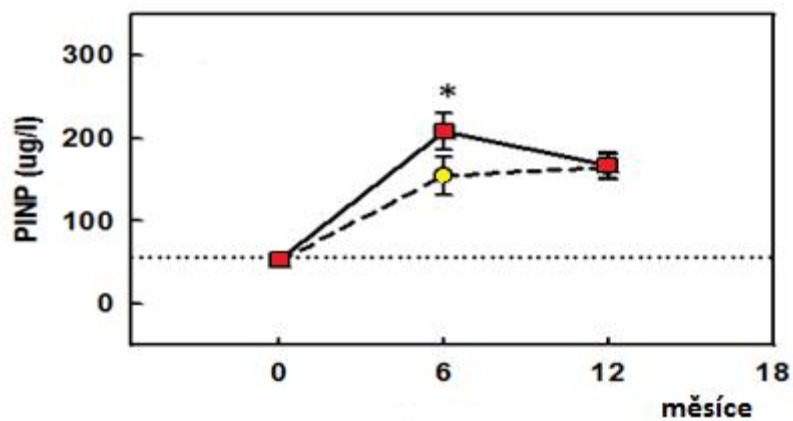


Změny TRAP 5b ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny přerušovanou čarou (●), ve večerních hodinách plnou čarou (■).

* je označen statisticky významný rozdíl ve změnách mezi léčebnými skupinami ($p < 0,05$).

Graf 5C

Průměrné změny (průměr ± SEM) N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I v séru (PINP) v séru u pacientek s postmenopauzální osteoporózou léčených teripartidem (TPTD)



Změny TRAP 5b ve skupině pacientek léčených TPTD v ranních hodinách jsou znázorněny přerušovanou čarou (●), ve večerních hodinách plnou čarou (■).

* je označen statisticky významný rozdíl ve změnách mezi léčebnými skupinami ($p < 0,05$).

5 Diskuze

Léba exogenním PTH má na kost anabolické i katabolické účinky v závislosti na koncentraci a délce expozice (Dobnig *et al.*, 1997). Delší expozice PTH například v případě kontinuální infuze (Hock a Gera, 1992) nebo trvale zvýšené koncentrace endogenního PTH u pacientů s primární hyperparatyreózou vede k nadměrné stimulaci osteoresorpce (Mosekilde, 2008), naproti tomu krátkodobá expozice PTH například po jednorázové subkutánní aplikaci vede k větší stimulaci kostní novotvorby (Podbesek *et al.*, 1983). Existence fyziologického cirkadiánního rytmu kostní remodelace (Wichers *et al.*, 1999; Qvist *et al.*, 2002; Eastell *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1992), který u zdravých osob koreluje s cirkadiánními změnami endogenního PTH a fosfátů v séru (Joseph *et al.*, 2007) svědčí pro vzájemnou souhru kostního a fosfokalciového metabolismu. Zda-li účinnost léků TPTD závisí na denní době jeho aplikace, zatím nebylo u lidí studováno. Cílem naší práce bylo ověřit hypotézu, že senzitivita skeletu vůči působení TPTD závisí na denní době jeho aplikace.

V první pilotní studii u žen s postmenopauzální osteoporózou jsme zjistili, že denní doba aplikace TPTD je schopna výrazně ovlivnit denní změny markerů kostního obrátu, sérového kalcia i endogenní sekrece PTH. Při léčbě TPTD aplikovaným večer (~ ve 20:00 hod) se změny markerů kostní resorpce (CTX) blížily fyziologickému cirkadiánnímu rytmu a dosahovaly nejnižších hodnot mezi 11:00- 14:00 hod a vrcholu mezi 23:00 - 02:00 hod. Ranní podávání TPTD (~ v 08:00 hod) mělo za následek výrazné snížení amplitudy rytmu se zvýšením CTX mezi 08:00 - 14:00 hod a následným snížením koncentrací až do 20:00 hod a pak opět s nárůstem CTX během nočních hodin. Tyto změny CTX po ranní aplikaci TPTD lze charakterizovat spíše jako circasemidiánní (2 vrcholy) než cirkadiánní. Paralelní změny koncentrace iCa a CTX, naznačují, že změny v sérové koncentraci iCa mohou odrážet změny v resorpční aktivitě osteoklastů. Plazmatické koncentrace endogenního PTH se výrazně snížily 3-6 hodin po podání TPTD a profily sérového iCa a endogenního PTH byly signifikantně nepřímo úměrné, což naznačuje, že funkce periférních tělísek je během léčby TPTD zachována. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které dokumentovaly inverzní korelaci mezi cirkadiánními změnami sérového iCa a endogenního PTH (Calvo *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1991).

Naše výsledky ukazují, že citlivost osteoklastů na léčbu TPTD se liší v závislosti na denní době podání TPTD. Procentuální nárůst sérové koncentrace CTX během prvních 6 hodin po podání TPTD byl výrazněji po večerní aplikaci TPTD ve srovnání s jeho ranní

aplikací ($p = 0,009$; $+22 \pm 56\%$ vs. $+94 \pm 38\%$, ranní vs. večerní léčba TPTD). Mechanismy, které by vysvětlily rozdílnou citlivost skeletu v závislosti na denní době aplikace TPTD nejsou v současné době objasněny. Na buněčné úrovni se zvýšení kostní resorpce po podání PTH vysvětluje nepřímo působením PTH na osteoklasty, zejména stimulací RANKL v osteoblastech (a pravděpodobně i v osteocytech) a souasně poklesem v produkci osteoprotegerinu (OPG), který působí jako solubilní receptor pro RANKL (Onyia *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001). Dosud nebyly zjištěny cirkadiánní změny v expresi RANKL v kostním mikroprostředí, ani cirkadiánní změny v sérové koncentraci RANKL. V recentní studii byla ale dokumentována existence cirkadiánního rytmu cirkulujícího OPG s denním vzestupem a nočním poklesem koncentrace OPG u zdravých osob. Navíc, změny cirkulujícího OPG byly nepřímo úměrné sekreci endogenního PTH a koncentracím CTX v průběhu 24 hodin (Joseph *et al.*, 2007). Lze předpokládat, že cirkadiánní změny v sekreci OPG mohou alespoň částečně modulovat efekt léčby TPTD na resorpční aktivitu osteoklastů. Úinek léčby PTH na osteoklasty může být v ranních hodinách utlumen také příjmem potravy, která potlačuje resorpční aktivitu osteoklastů (Clowes *et al.*, 2002). Kalcium v potravě může stimulovat produkci endogenního kalcitoninu nebo dalších osteoklasty inhibujících peptidů, jako GLP-2 (Bjarnason *et al.*, 2002), a tím zmírnit stimulační úinek TPTD na osteoklasty. V pokusech na zvířatech vedlo současné podávání lososího kalcitoninu s PTH k akutní supresi PTH indukovaného zvýšení markerů kostní remodelace a ke snížení osteoanabolického efektu dlouhodobé léčby PTH (Gooi *et al.*, 2010). Na druhou stranu, osteoklasty jsou výrazně méně ovlivněny příjmem potravy v pozdním odpolední a večerních jednotlivě (Bjarnason *et al.*, 2002). Další studie by měly objasnit, zdali rozdíly v cirkadiánní variabilitě CTX při ranním a večerním podávání TPTD souvisí více s příjmem potravy nebo s dobou aplikace léku.

Rovněž koncentrace markeru kostní novotvorby (PINP) se výrazně lišily v závislosti na době podání TPTD ($p = 0,001$), ale rozdíly byly mnohem menší, nežli změny markeru kostní resorpce CTX. Sérové koncentrace PINP mírně, ale signifikantně ($p < 0,05$) klesly po 6 hodinách po ranním i večerním podání TPTD, s následným mírným vzestupem koncentrací PINP v obou skupinách. Odpověď sérového PINP v naší studii pravděpodobně dokumentuje skutečnost, že syntéza kolagenu je asociována s jeho degradací během osteoresorpce. Celková průměrná hodnota PINP za 24 hodin se mezi skupinami významně nelišila, pravděpodobně vzhledem k velké interindividuální variabilitě.

Tato studie prokázala, že se cirkadiánní změny kostní remodelace, zejména kostní resorpce, iCa i endogenního PTH významně liší v závislosti na denní době podání TPTD.

Výsledky podpořily hypotézu, že odezva kostních buněk na léčbu TPTD se liší v závislosti na denní době jeho podání. Další studium je nezbytné k objasnění mechanismů rozdílné odpovědi kostních buněk na léčbu TPTD během dne. Otázku, zda denní doba podání TPTD má i dlouhodobý dopad na změny BMD, jsme řešili v následující studii.

Studie II

Studie II je první pilotní prací, která ukázala, že denní doba aplikace TPTD má význam pro dlouhodobé změny markerů kostní remodelace a BMD u pacientek s postmenopauzální osteoporózou. Ranní aplikace TPTD po dobu 12 měsíců vedla k významnému výtvarnému nárůstu BMD v oblasti bederní páteře ve srovnání s večerní aplikací TPTD. Tyto výsledky mohou být vysvětleny odlišnou citlivostí kostních buněk na TPTD v závislosti na denní době jeho podání. Ranní koncentrace TRAP 5b ve večerní léčebné skupině ale ukázala významný výtvarný nárůstek během prvních 6 měsíců léčby TPTD ve srovnání s ranní léčebnou skupinou, na rozdíl od CTX, kde jsme rozdíly mezi skupinami neprokázali. Koncentrace TRAP 5b totiž na rozdíl od CTX, odráží spíše počet osteoklastů než jejich aktivitu a TRAP 5b rovněž nevykazuje cirkadiální variabilitu (Henriksen *et al.*, 2007). V první studii jsme zjistili, že ranní podání TPTD oslabilo noční vzestup markeru kostní resorpce CTX na rozdíl od večerního podání, které významně akcelerovalo noční nárůstek CTX. Zatímco marker kostní resorpce CTX vrcholil kolem 02:00 hodiny ráno, hodnoty CTX nalaženy kolem 08:00 hodiny ráno byly srovnatelné v obou léčebných skupinách. To nám také vysvětlilo neexistující rozdíly CTX v séru mezi skupinami ve studii II, kdy byly sérové markery měřeny pouze v ranních hodinách.

Vzhledem k tzv. fenoménu spřažení (coupling) je nárůstek kostní resorpce po večerní aplikaci TPTD spojen také se zvýšením koncentrace PINP. Zdá se však, že výtvarný vzestup kostní formace ve večerní léčebné skupině nedostačuje k vyrovnání úniku nadměrně zvýšené kostní resorpce během nočních hodin. Naše výsledky v 1. studii již naznačily, že večerní podávání TPTD nadměrně stimuluje i noční vrchol aktivity osteoklastické kostní resorpce, a tím může zpomalit nárůstek BMD. Proto vyžaduje kostní resorpce pozorování v 6. měsíci léčby ve večerní léčebné skupině může být jedním z možných vysvětlení pro nižší nárůstek BMD v oblasti bederní páteře po roce léčby TPTD u této skupiny pacientů. Naopak podávání antiresorpčního přípravku ve večer by mohlo oslabit noční nárůstek kostní resorpce. Podle Blumsohna a spol. (1994) vedla perorální suplementace kalcie po dobu 14 dnů k ústavnímu potlačení vrcholu PTH v noci a souvisně také k oslabení nočního vzestupu kostní resorpce u zdravých premenopauzálních žen v případě, že byl vápník podáván ve 23

hod, ale nikoliv v 8 hod ráno. Dlouhodobé výsledky, zejména změny BMD v závislosti na době podávání kalcia, ale nejsou k dispozici. Snídaně a / nebo příjem kalciového přípravku ráno oslabuje účinek ranní injekce TPTD na resorpční aktivitu osteoklastů; což by mohlo být vysvětlením pro větší nárůst BMD v oblasti bederní páteře. To je v souladu s výsledky Deal a spol. (2005), kteří zjistili, že souasná léčba raloxifenem (mírným inhibitorem kostní resorpce) a TPTD oslabila zvýšení kostní resorpce pozorované při samotné léčbě TPTD a měla významný vliv na BMD v oblasti celkového proximálního femuru ve srovnání se samotnou léčbou TPTD.

Výšší nárůst BMD v ranní skupině byl spojen s nižším nárůstem PINP ve srovnání s večerní skupinou. Toto zjištění je v rozporu s výsledky studie, kde časné zvýšení PINP (1-3 měsíce po zahájení léčby TPTD) predikovalo výraznější nárůst BMD v oblasti bederní páteře (Dobnig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Blumsohn *et al.*, 2011). Je pozoruhodné, že v těchto studiích nebyla denní doba podávání TPTD blíže specifikována. V naší studii nebyla sérová koncentrace PINP měřena po 1 nebo 3 měsících, kdy má TPTD převážně efekt na kostní remodelaci (Lindsay *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 2007) a "anabolické okno" je nejvíce (Girotra *et al.*, 2006). S pokračující léčbou TPTD je zachována pévaha kostní novotvorby nad kostní resorpcí, dynamika nárůstu BMD je však nižší vzhledem k nárůstu i kostní resorpce. V důsledku toho je novotvorba kosti při léčbě TPTD spojená hlavně s kostní remodelací (Lindsay *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, žeinnost osteoklastů a osteoblastů je propojena prostřednictvím normálního procesu kostní remodelace (Parfitt *et al.*, 1982), může být vliv nárůstu PINP ve večerní léčebné skupině (studie I) způsoben vlivem kostní resorpce a kostní remodelací ve srovnání s ranní skupinou pacientů. Skutečně byla zjištěna silná pozitivní korelace mezi změnami koncentrací TRAP 5b, stejně jako CTX s PINP po 6 měsících léčby TPTD ($r=0,621$ a $r = 0,750$ pro TRAP 5b a CTX resp., $p < 0,0001$ pro oba). Avšak zatímco rozdíl ve změnách PINP mezi oběma skupinami vymizely po 12 měsících léčby TPTD, sérové koncentrace TRAP 5b měly tendenci být vyšší i po 12 měsících léčby ve večerní léčebné skupině ve srovnání s ranní skupinou.

Změny plošné BMD během prvních 12 měsíců léčby TPTD souvisí zejména s pokračující mineralizací nové kostní matrix, tedy menší změna plošné BMD nemusí nutně znamenat nižší osteoanabolický efekt léčby. Ve skutečnosti může plošná BMD podhodnocovat zlepšení kostní hmoty v důsledku zvýšeného objemu relativně nemineralizovaného osteoidu. BMD v oblasti distálního radia výrazně klesala v obou léčebných skupinách pacientů bez významných rozdílů. Pokles plošné BMD v oblasti distálního radia odráží pravděpodobně velmi aktivní endokortikální a intrakortikální kostní

remodelaci (Foldes *et al.*, 1991). Biomechanické studie prokázaly, že pevnost kosti i přes pokles BMD při léčbě TPTD neklesá (Delmas *et al.*, 2006).

Nadě studie mají několik omezení. Za prvé, s ohledem na nízký počet pacientů a pilotní observační design studie, vyžadují závěry studií další ověření. Tyto studie ale byly prvními pracemi, které hodnotily vliv denní doby aplikace TPTD na skelet u lidí a to nejen akutní změny, ale i dlouhodobé změny biochemických markerů kostní remodelace a BMD. Za druhé, byla hodnocena plošná BMD, která hodnotí průměrnou hustotu mineralizace osteoidu a nikoli skutečnou hustotu kostní hmoty a také nerozlišuje mezi trabekulární a kortikální kostí. Ke studiu anabolických účinků různých léčebných režimů TPTD na kost u lidí jsou proto potřebné i další metody, jako například transiliakální kostní biopsie nebo využití vysoce rozlišovacího CT a MRI. Zajímavé výsledky by mohly přinést i nové aplikace DXA, například tzv. TBS (Trabecular Bone Score).

I přes tato omezení naše studie ukázala, že rovněž léčba TPTD při denní aplikaci ráno vedla k významnému zvýšení hustoty BMD v oblasti bederní páteře ve srovnání s večerním režimem léčby. Výsledky studie podporují hypotézu, že odpověď skeletu na léčbu TPTD významně ovlivňuje denní doba její aplikace. Tyto výsledky mohou mít význam pro zvýšení dlouhodobé účinnosti léčby TPTD, ale další výzkum je nezbytný pro zjištění mechanismů rozdílné odpovědi kostních buněk na TPTD během dne.

5 Závěr

Výsledky naší práce lze shrnout následovně :

- Denní doba podání TPTD výrazně ovlivňuje cirkadiánní rytmus markerů kostní remodelace, ionizovaného kalcia a endogenního PTH. Aplikace TPTD po večeři (~ ve 20 hod) prohloubila fyziologický cirkadiánní rytmus kostní resorpce (CTX) se signifikantním nárůstem CTX v noci a s poklesem jeho koncentrací dopoledne, zatímco ranní léčba TPTD (aplikace před snídaní ~ v 8 hod) vedla k signifikantnímu oploštění amplitudy CTX. Cirkadiánní změny PINP vykazovaly mnohem menší amplitudu než CTX a po aplikaci TPTD jsme zaznamenali přechodný, ale významný pokles koncentrace PINP (na rozdíl od nárůstu CTX).
- Ranní léčba TPTD podávaná před snídaní (~ v 8 hod) vedla ke statisticky významnému vzestupu BMD v oblasti bederní páteře ve srovnání s večerní aplikací TPTD (~ ve 20 hod). Změny markerů kostní resorpce TRAP 5b a novotvorby PINP vykazovaly přesný opačný trend než BMD s tímto vzestupem obou markerů ve skupině s večerní aplikací TPTD. Nadměrný vzestup kostní resorpce během noci pravděpodobně vysvětluje menší nárůst BMD ve večerní TPTD skupině. Naproti tomu ranní vzestup kostní resorpce je oslaben vzhledem k inhibičnímu účinku potravy na kostní resorpci, zejména během ranních a dopoledních hodin. Zdá se, že vyšší nárůst BMD po ranní aplikaci TPTD je v souladu s tímto osteoanabolickým účinkem TPTD (včetně nárůstu osteoidu) vyřazuje další ověření.

Obě studie byly prvními pilotními projekty, které zkoumaly vliv denní doby aplikace TPTD na BMD a biochemické markery kostního obrátu u pacientek s postmenopauzální osteoporózou. Výsledky jsou v souladu s hypotézou, že odezva kostních buněk na léčbu TPTD závisí na době jeho podání. Denní doba aplikace TPTD může být dleřitá pro dlouhodobou účinnost této léčby. Ověření našich výsledků a vysvětlení mechanismů rozdílné odpovědi kostních buněk na TPTD vyřazuje další výzkum.

6 Abstrakt

Cirkadiánní rytmus parathormonu (PTH) je dobře dokumentován, ale jeho fyziologická úloha není zcela objasněna. U zdravých osob sledují biochemické markery kostní remodelace podobný cirkadiánní rytmus jako PTH s nočním vzestupem kostní resorpce a novotvorby. Ztráta diurnální variability PTH byla pozorována nejen u pacientů s primární hyperparatyreózou, ale také u pacientek s postmenopauzální osteoporózou. Kontinuálně zvýšené koncentrace PTH vedou k nadměrné stimulaci kostní resorpce, naproti tomu intermitentní podávání PTH má u pacientů s osteoporózou silný osteoanabolický účinek. Zatím nebylo zkoumáno, zda senzitivita skeletu vůči působení exogenního PTH závisí také na denní době jeho aplikace. Cílem naší práce bylo ověřit hypotézu, že aplikace teriparatidu (TPTD, lidského rekombinantního PTH [1-34]) v ranní dobu ovlivňuje fyziologický cirkadiánní rytmus kostní remodelace a také denzitu kostního minerálu (BMD) při dlouhodobé léčbě TPTD.

Do první studie bylo zahrneno 14 žen s postmenopauzální osteoporózou léčených TPTD v dávce 20 µg denně, aplikovaným subkutánně buď ráno před snídaní (~ v 8:00 hod) anebo po večeři (~ ve 20:00 hod). Byly hodnoceny sérové koncentrace C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (CTX), N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP), ionizovaného kalcia (iCa) a koncentrace plazmatického intaktního PTH v průběhu 24 hodin. Výsledky prokázaly signifikantní závislost všech změřených parametrů na denní době. Ve večerní léčbě TPTD signifikantně prohloubila amplitudu cirkadiánního rytmu markeru kostní resorpce

CTX, zatímco ranní aplikace TPTD vedla k opoždění rytmu CTX. Cirkadiánní rytmus markeru kostní novotvorby PINP vykazoval výrazně menší amplitudu než CTX. Změny iCa během 24 hodin pozitivně korelovaly se změnami CTX ($p < 0,001$) a negativně se změnami PTH ($p < 0,001$). K následné ranní léčbě TPTD, který byl aplikován buď ráno před snídaní (~ v 8:00 hod) anebo po večeři (~ ve 20:00 hod), bylo randomizováno celkem 50 pacientek s postmenopauzální osteoporózou. Ve večerní podávání TPTD vedlo po 6 měsících léčby k významnému vzestupu markeru kostní novotvorby - PINP (+358% vs. +215%) a také markeru kostní resorpce - tartrát rezistentní kyselý fosfatázy isoenzymu 5b (+70% vs. +37%), ve srovnání s ranní aplikací ($p < 0,05$). Po roce léčby TPTD došlo k významnému vzestupu BMD v oblasti bederní páteře v obou skupinách ($p < 0,001$), ale signifikantní vzrost BMD ($p < 0,05$) byl zjištěn po ranním podávání TPTD (+ 9,1 %) v porovnání s večerním režimem (+ 4,8%).

Prokázali jsme, že denní doba podání TPTD významně moduluje jak cirkadiánní rytmus kostní remodelace, tak cirkadiánní změny kalcia v séru a endogenního PTH v plazmě u žen s postmenopauzální osteoporózou. Ranní léčba TPTD podávaným ráno vedla k významnému vzestupu BMD v oblasti bederní páteře ve srovnání s večerním režimem léčby. Výsledky studie podporují hypotézu, že odpověď skeletu na léčbu TPTD významně ovlivňuje denní doba jeho aplikace. Tyto výsledky mohou mít význam pro zvýšení dlouhodobé účinnosti léčby TPTD.

Klíčová slova: cirkadiánní rytmus, kostní remodelace, osteoporóza, parathormon, teriparatid

Summary

Circadian rhythm of parathyroid hormone (PTH) is well documented, but its physiological role is not fully understood. In healthy individuals, biochemical markers of bone remodeling follow a similar circadian rhythm to PTH with a nocturnal rise in bone resorption and formation. The loss of PTH diurnal variation was observed not only in primary hyperparathyroidism, but also in patients with postmenopausal osteoporosis. Continuously elevated concentrations of PTH lead to excessive stimulation of bone resorption, whereas intermittent PTH administration has a strong osteoanabolic effect in patients with osteoporosis. It has not been examined whether the skeletal sensitivity to PTH action depends also on the time of its application.

The aim of our study was to verify the hypothesis that the application of teriparatide (TPTD, recombinant human PTH [1-34]) at different times of the day in the context of its diurnal variability affects the physiological circadian rhythm of bone remodeling and also the bone mineral density (BMD) after the long-term TPTD treatment.

Fourteen women with postmenopausal osteoporosis treated with 20 micrograms of TPTD daily, applied subcutaneously either in the morning or evening, were included in the first study. The concentration of serum C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX), N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), serum ionized calcium (iCa) and plasma intact PTH concentrations were evaluated within 24 hours. The results showed a significant dependence of all measured parameters on the time of day. Evening TPTD treatment significantly enhanced the amplitude of the circadian rhythm of bone resorption marker

CTX, while morning TPTD applications led to the flattening of CTX rhythm. Circadian rhythm of bone formation marker PINP showed a significantly smaller amplitude than seen in CTX. Changes in serum iCa were positively related to changes in serum CTX ($p < 0,001$) and negatively related to changes in PTH ($p < 0,001$).

Fifty women with established postmenopausal osteoporosis were randomized to 12-month treatment with 20 µg of TPTD, administered daily either in the morning (before breakfast, at 8.00 a.m.) or in the evening (after dinner, at 8.00 p.m.). After 6 months, the evening teriparatide treatment resulted in a more pronounced increase in bone formation marker - PINP (+358% vs. 215%) as well as bone resorption marker - tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (+70% vs. +37%) when compared with the morning treatment arm ($p < 0,05$). After 12 months of TPTD treatment, the lumbar spine BMD grew markedly in both treatment groups ($p < 0,001$) with a significantly greater increase in the morning arm (+9,1%) compared to the evening arm (4,8%).

We have shown that timing of TPTD treatment significantly modulates the circadian rhythm of bone turnover markers as well as calcium-parathyroid axis in women with postmenopausal osteoporosis. 12-month morning administration of TPTD resulted in a larger increase in the lumbar spine BMD than the evening application. These results support the hypothesis that timing of TPTD administration significantly affects the skeletal response to TPTD treatment. Timing of TPTD treatment can be important for increasing its long-term efficacy.

Keywords: circadian rhythm, bone remodeling, osteoporosis, parathyroid hormone, teriparatide

7 Seznam literatury

1. ABE, E., R.C. MARIANS , W. YU , X.B. WU, T. ANDO , Y. LI , J. IQBAL, L. ELDEIRY, G. RAJENDREN, H.C. BLAIR, T.F. DAVIES a M. ZAIDI. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. 2003, ro . 115, . 4, s. 151-162.
2. ABOU-SAMRA, A.B., H. JÜPPNER , T. FORCE , M.W. FREEMAN, X.F. KONG, E. SCHIPANI, P. URENA , J. RICHARDS, J.V. BONVENTRE a J.T. POTTS Jr et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, ro . 89, . 7, s. 2732-2736.
3. AHMAD, A.M., M.T. HOPKINS, W.D. FRASER, C.G. OOI, B.H. DURHAM a J.P. VORA. Parathyroid hormone secretory pattern, circulating activity, and effect on bone turnover in adult growth hormone deficiency. *Bone*. 2003, ro . 32, . 2, s. 170-179.
4. ALMADEN, Y., A. CANALEJO, A. HERNANDEZ, E. BALLESTEROS, S. GARCIA-NAVARRO, A. TORRES a M. RODRIGUEZ. Direct effect of phosphorus on parathyroid hormone secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Miner Res*. 1996, ro . 11, . 7, s. 970-976. BALSALOBRE, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*. 2002, ro . 309, . 1, s. 193- 199.
5. BEN-DOV, I.Z., H. GALITZER, V. LAVI-MOSHAYOFF, R. GOETZ, M. KURO-O, M. MOHAMMADI, R. SIRKIS, T. NAVEH-MANY a J. SILVER. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007, ro . 117, . 12, s. 4003-4008.
6. BERSON, S.A. a R.S. YALOW. Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1968, ro . 28, . 7, s. 1037-1047.
7. BIKLE, D.D. Growth hormone/insulin-like growth factor-1/PTH axis in bone. *J Bone Miner Res*. 2008, ro . 23, . 5, s. 581-583.
8. BJARNASON, N.H., E.E. HENRIKSEN, P. ALEXANDERSEN, S. CHRISTGAU, D.B. HENRIKSEN a C. CHRISTIANSEN. Mechanism of circadian variation in bone resorption. *Bone*. 2002, ro . 30, . 1, s. 307-313.
9. BLACK, D.M., S.L. GREENSPAN, K.E. ENSRUD, L. PALERMO, J.A. MCGOWAN., T.F. LANG, P. GARNERO, M.L. BOUXSEIN, J.P. BILEZIKIAN, C.J. ROSEN a PATH STUDY INVESTIGATORS. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2003, ro . 349, . 13, s. 1207-1215.

10. BLUMSOHN, A., K. HERRINGTON, R.A. HANNON, P. SHAO, D.R. EYRE A R. EASTELL. The effect of calcium supplementation on the circadian rhythm of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, ro . 79, . 3, s. 730-735.
11. BLUMSOHN, A., F. MARIN, T. NICKELSEN, K. BRIXEN, G. SIGURDSSON, J. GONZÁLEZ DE LA VERA, S. BOONEN, S. LIU-LÉAGE, C. BARKER A R. EASTELL. Early changes in biochemical markers of bone turnover and their relationship with bone mineral density changes after 24 months of treatment with teriparatide. EUROFORS Study Group. *Osteoporos Int.* 2011, ro . 22, . 6, s. 1935- 1946.
12. BOLLAG, R.J., Q. ZHONG, P. PHILLIPS, L. MIN, L. ZHONG, R. CAMERON, A.L. MULLOY, H. RASMUSSEN, F. QIN, K.H. DING A C.M. ISALES. Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. *Endocrinol.* 2000, ro . 141, . 3, s. 1228-1235.
13. BONADONNA, S., A. BURATTIN, M. NUZZO, G. BUGARI, E.A. ROSEI, D. VALLE, N. IORI, J.P. BILEZIKIAN, J.D. VELDHUIS A A. GIUSTINA. Chronic glucocorticoid treatment alters spontaneous pulsatile parathyroid hormone secretory dynamics in human subjects. *Eur J Endocrinol.* 2005, ro . 152, . 2, s. 199-205.
14. BROSSARD, J.H., M. CLOUTIER, L. ROY, R. LEPAGE, M. GASCON-BARRÉ A P. D'AMOUR. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, ro . 81, . 11, s. 3923-3929.
15. BROWN, E.M. A S.C. HEBERT. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone.* 1997, ro . 20, . 4, s. 303-309.
16. BROWN, E.M. Calcium receptor and regulation of parathyroid hormone secretion. *Rev Endocr Metab Dis.* 2000, ro . 1, . 4, str. 307-315.
17. BROWN, E.M. A R.J. MACLEOD. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 2001, ro . 81, str. 239-297.
18. CALVO, M.S., R. KUMAR A H. HEATH. Persistently elevated parathyroid hormone secretion and action in young women after four weeks of ingesting high phosphorus, low calcium diets. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990, ro . 70, . 5, s. 1334-1340.
19. CALVO, M.S., R. EASTELL, K.P. OFFORD, E.J. BERGSTRALH A M.F. BURRITT. Circadian variation in ionized calcium and intact parathyroid hormone: evidence for sex differences in calcium homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991, ro . 72, . 1, s. 69-76.

- 20.** CASTRO, J.H., S.M. GENUTH a L. KLEIN. Comparative response to parathyroid hormone in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Metabolism*. 1975, ro . 24, . 7, s. 839-848.
- 21.** CLOWES, J.A., R.A. HANNON, T.S. YAP, N.R. HOYLE, A. BLUMSOHN a R. EASTELL. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone*. 2002, ro . 30, . 6, s. 886-890.
- 22.** DAVEY, R.A., A.G. TURNER, J.F. MCMANUS, W.S. CHIU, F. TIAHYONO, A.J. MOORE, G.J. ATKINS, P.H. ANDERSON, C. MA, V. GLATT, H.E. MACLEAN, C. VINCENT, M. BOUXSEIN, H.A. MORRIS, D.M. FINDLAY a J.D. ZAJAC. Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice. *J Bone Miner Res*. 2008, ro . 23, . 8, s. 1182-1193.
- 23.** DEAL, C., M. OMIZO, E.N. SCHWARTZ, E.F. ERIKSEN, P. CANTOR, J. WANG, E.V. GLASS, S.L. MYERS a J.H. KREGE. Combination teriparatide and raloxifene therapy for postmenopausal osteoporosis: results from a 6-month double-blind placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2005, ro . 20, . 11, s. 1905-1911.
- 24.** DELMAS, P.D., A.A. LICATA, J.Y. REGINSTER, G.C. CRANS, P. CHEN, D.A. MISURSKI, R.B. WAGMAN a B.H. MITLAK. Fracture risk reduction during treatment with teriparatide is independent of pretreatment bone turnover. *Bone*. 2006, ro . 39, . 2, s. 237-243. DEMIRALP, B., H.L. CHEN, A.J. KOH, E.T. KELLER a L.K. MCCAULEY. Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos. *Endocrinology*. 2002, ro . 43, . 10, s. 4038-4047.
- 25.** DOBNIG, H. a R.T. TURNER. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology*. 1997, ro . 138, . 11, s. 4607 - 4612.
- 26.** DOBNIG, H., A. SIPOS, Y. JIANG, A. FAHRLEITNER-PAMMER, L.G. STE-MARIE, J.C. GALLAGHER, I. PAVO, J. WANG a E.F. ERIKSEN. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, ro . 90, . 7, s. 3970-3977.
- 27.** DUNCAN, W.C. Jr. Circadian rhythms and the pharmacology of affective illness. *Pharmacol Ther*. 1996, ro . 71, . 3, s. 253-312.
- 28.** EASTELL, R., M.S. CALVO, M.F. BURRIT, K.P. OFFORD, R.G. RUSSELL a B.L. RIGGS. Abnormalities in circadian patterns of bone resorption and renal calcium conservation in type I osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992, ro . 74, . 3, s. 487-494.

- 29.** EL-HAJJ FULEIHAN, G., E.B. KLERMAN, E.N. BROWN, Y. CHOE, E.M. BROWN a C.A. CZEISLER. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous--a general clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, ro . 82, . 1, s. 281-286.
- 30.** EZZAT, S., S. MELMED, D. ENDRES, D.R. EYRE a F.R. SINGER. Biochemical assessment of bone formation and resorption in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, ro . 76, . 6, s. 1452-1457.
- 31.** FINKELSTEIN, J.S, J.J. WYLAND, H. LEE a R.M. NEER. Effects of teriparatide, alendronate, or both in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, ro . 95, . 4, s. 1838-1845.
- 32.** FOLDES, J., A.M. PARFITT, M.S. SHIH, D.S. RAO a M. KLEEREKOPER. Structural and geometric changes in iliac bone: relationship to normal aging and osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1991, ro . 6, . 7, s. 759-766.
- 33.** FRASER, W.D., F.C. LOGUE, J.P. CHRISTIE, D.A. CAMERON, D.S. O'REILLY a G.H. BEASTALL. Alteration of the circadian rhythm of intact parathyroid hormone following a 96-hour fast. *Clin Endocrinol.* 1994, ro . 40, . 4, s. 523-528.
- 34.** FRASER, W.D., F.C. LOGUE, J.P. CHRISTIE, S.J. GALLACHER, D. CAMERON, D. S. O'REILLY, G.H. BEASTALL a I.T. BOYLE. Alteration of the circadian rhythm of intact parathyroid hormone and serum phosphate in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1998, ro . 8, . 2, s. 121-126.
- 35.** FRASER, W.D., A.M. AHMAD a J.P.VORA. The physiology of the circadian rhythm of parathyroid hormone and its potential as a treatment for osteoporosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004, ro . 13, . 4, s. 437-444.
- 36.** FU, L., M.S. PATEL, A. BRADLEY, F.F. WAGN a G. KASENTY. The molecular clock mediates leptin- regulated bone formation. *Cell.* 2002, ro . 122, . 5, s. 803-815.
- 37.** GALITZER, H., I. BEN-DOV, V. LAVI-MOSHAYOFF, T. NAVEH-MANY a J. SILVER. Fibroblast growth factor 23 acts on the parathyroid to decrease parathyroid hormone secretion. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008, ro . 17, . 4, s. 363 -367.
- 38.** GALLAGHER, S.J., W.D. FRASER a F.C. LOGUE. The loss of diurnal rhythm of PTH secretion in untreated pseudohypoparathyroidism. *Bone.* 1991, ro . 12, s. 297.
- 39.** GALLIFORD, T.M., E. MURPHY, A.J. WILLIAMS, J.H. BASSETT a G.R. WILLIAMS. Effects of thyroid status on bone metabolism: a primary role for thyroid stimulating hormone or thyroid hormone? *Minerva Endocrinol.* 2005, ro . 30 . 4, s. 237-246. GARNERO, P., R.E. SORNAY, M.C. CHAPUY A P.D. DELMAS. Increased bone

turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996, ro . 11, . 3, s. 337-349.

40. GAY, C.V., B, ZHENG a V.R. GILMAN. Co-detection of PTH/PTHrP receptor and tartrate resistant acid phosphatase in osteoclasts. *J Cell Biochem.* 2003, ro . 1, . 89, s. 902-908.
41. GENERALI, D., A. BERRUTI, M. TAMPELLINI, A. DOVIO, S. TEDOLDI, S. BONARDI, M. TUCCI, G. ALLEVI, S. AGUGGINI, M. MILANI, A. BOTTINI, L. DOGLIOTTI a A. ANGELI. The circadian rhythm of biochemical markers of bone resorption is normally synchronized in breast cancer patients with bone lytic metastases independently of tumor load. *Bone.* 2007, ro . 40, s. 1826-188.
42. GENERALI, D., A. DOVIO, M. TAMPELLINI, M. TUCCI, S. TEDOLDI, M. TORTA, S. BONARDI, G. ALLEVI, S. AGUGGINI, M. MILANI, A.L. HARRIS, A. BOTTINI, L. DOGLIOTTI, a A. ANGELI. Berruti. Changes of bone turnover markers and serum PTH after night or morning administration of zoledronic acid in breast cancer patients with bone metastases. *Br J Cancer.* 2008, ro . 98, . 11, s. 1753-1758.
43. GIMBLE, J.M., Z.E. FLOYD a B.A. BUNNELL. The 4th dimension and adult stem cells: Can timing be everything? *J Cell Biochem.* 2009, ro . 107, . 4, s. 569-578.
44. GIROTRA, M., M.R. RUBIN a J.P. BILEZIKIAN. The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006, ro . 7, s. 113-121.
45. GOLOMBEK, D.A. a R.E. ROSENSTEIN. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev.* 2010, ro . 90, . 3, s. 1063-1102.
46. GOOI, J.H., S. POMPOLO, M.A. KARSDAL, N.H. KULKARNI, I. KALAJZIC, S.H. MCAHREN, B. HAN, J.E. ONYIA, P.W. HO, M.T. GILLESPIE, N.C. WALSH, L.Y. CHIA, J.M. QUINN, T.J. MARTIN a N.A. SIMS. Calcitonin impairs the anabolic effect of PTH in young rats and stimulates expression of sclerostin by osteocytes. *Bone.* 2010, ro . 46, . 6, s. 1486-1497.
47. GOTTSCHALCK, I.B., P.B. JEPPESEN, J.J. HOLST a D.B. HENRIKSEN. Reduction in bone resorption by exogenous glucagon-like peptide-2 administration requires an intact gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol.* 2008, ro . 43, . 3, s. 929-937.
48. GRUNDBERG, E., H. BRÄNDSTRÖM, K.C. LAM, S. GURD, B. GE, E. HARMSSEN, A. KINDMARK, O. LJUNGGREN, H. MALLMIN, O. NILSSON a T. PASTINEN. Systematic assessment of the human osteoblast transcriptome in resting and induced primary cells. *Physiol Genomics.* 2008, ro . 33, . 3, s. 301-311.

- 49.** HABENER, J.F., M. AMHERDT, M. RAVAZZOLA a L. ORCI. Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. *J Cell Biol.* 1979, ro . 80, . 3, s. 715-731.
- HALBERG, F. Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Int Z Vitaminforsch Beih.* 1959, ro . 10, s. 225-296.
- 50.** HARMS, H.M., O. NEUBAUER, C. KAYSER, P.R. WÜSTERMANN, R. HORN, U. BROSA, E. SCHLINKE, W.R. KÜLPMANN, A. VON ZUR MÜHLEN a R.D. HESCH. Pulse amplitude and frequency modulation of parathyroid hormone in early postmenopausal women before and on hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, ro . 78, . 1, s. 48-52.
- 51.** HARMS, H.M., E. SCHLINK, O. NEUBAUER, C. KAYSER, P.R. WÜSTERMANN, R. HORN, W. R. KÜLPMANN, A VON ZUR MÜHLEN a R.D. HESCH. Pulse amplitude and frequency modulation of parathormone in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, ro . 78, . 1, s. 53-57.
- 52.** HASHIZUME, Y., S. WAGURI, T. WATANABE, E. KOMINAMI a Y. UCHIYAMA. Cysteine proteinases in rat parathyroid cells with special reference to their correlation with parathyroid hormone (PTH) in storage granules. *J Histochem Cytochem.* 1993, ro . 41, . 2, s. 273-282.
- 53.** HASTINGS, M., A. REDDY a E. MAYWOOD. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Na Rev Neurosci.* 2003, ro . 4, . 8, s. 649-661.
- 54.** HJALM, G., R.J. MACLEOD, O. KIFOR, N. CHATTOPADHYAY a E.M. BROWN. Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2001, ro . 276, str. 34880634887.
- 55.** HENRIKSEN, D.B., P. ALEXANDERSEN, N.H. BJARNASON, T. VILSBØLL, B. HARTMANN, E.E. HENRIKSEN, I. BYRJALSEN, T. KRARUP, J.J. HOLST a C. CHRISTIANSEN. Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Mine Res.* 2003, ro . 18, . 12, s. 2180-2189.
- 56.** HENRIKSEN, D.B., P. ALEXANDERSEN, I. BYRJALSEN, B. HARTMANN, H.G. BONE, C. CHRISTIANSEN a J.J. HOLST. Reduction of nocturnal rise in bone resorption by subcutaneous GLP-2. *Bone.* 2004, ro . 34, . 1, s. 140-147.

- 57.** HENRIKSEN, K., L.B. TANKO, P. QVIST, P.D. DELMAS, C. CHRISTIANSEN a M.A. KARSDAL. Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporos Int.* 2007, ro . 18, . 5, s. 681-685.
- 58.** HERNANDEZ, A., M.T. CONCEPCION, M. RODRIGUEZ, E. SALIDO a A. TORRES. High phosphate diet increases prepro PTH mRNA independent of calcium and calcitriol in normal rats. *Kidney Int.* 1996, ro . 50, . 6, s. 1872-1878.
- 59.** HERZOG, E. Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci.* 2007, ro . 8, . 10, s. 790-802.
- 60.** HOCK, J.M. a J. FONSECA. Anabolic effect of human synthetic parathyroid hormone (1-34) depends on growth hormone. *Endocrinology.* 1990, ro . 127, . 4, s. 1804-1810.
- 61.** HOCK, J.M. a I. GERA. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.* 1992, ro . 7, . 1, s. 65-72.
- 62.** HU, J., S.J. MCLARNON, S. MORA, J. JIANG, C. THOMAS, K.A. JACOBSON a A.M. SPIEGEL, A.M.: A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺ receptor critical for response to Ca²⁺. *J Biol Chem.* 2005, ro . 280, . 6, s. 5113-5120.
- 63.** CHANG, W., T.H. CHEN, S. PRATT a D. SHOBACK. Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C *J Biol Chem.* 2000, ro . 275, . 26, s. 19955-19963.
- 64.** CHATTOPADHYAY, N., M. BAUM, M. BAI, D. RICCARDI, S.C. HEBERT, H.W. HARRIS a E.M. BROWN. Ontogeny of the extracellular calcium-sensing receptor in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996, ro . 271, s. 736-743.
- 65.** CHEN, P., P.D. MILLER, R. RECKER, H. RESCH, A. RANA, I. PAVO a A.A. SIPOS. Increases in BMD correlate with improvements in bone microarchitecture with teriparatide treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2007, ro . 22, . 8, s. 1173-1180.
- 66.** CHEN, P., J.H. SATTERWHITE, A.A. LICATA, E.M.. LEWIECKI, A.A. SIPOS, D.M. MISURSKI a R.B. WAGMAN. Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2005, ro . 20, . 6, s. 962-970.
- 67.** CHEN, R.A. a W.G. GOODMAN. Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004, ro . 286, . 6, str. 1005-1011.

- 68.** CHENG, F. a P. HULLEY. The osteocyte--a novel endocrine regulator of body phosphate homeostasis. *Maturitas*. 2010, ro . 67, . 4, str. 327-338.
- 69.** JIANG, Y., J.J. ZHAO, B.H. MITLAK, O. WANG, H.K. GENANT a E.F. ERIKSEN. Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J Bone Miner Res*. 2003, ro . 18, . 11, s. 1932-1941.
- 70.** JILKA, R.L. Molecular and cellular mechanism of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*, 2007, ro . 40, . 6, s. 1434-1446.
- 71.** JOSEPH, F., A.M. AHMAD, M. UL-HAQ, B.H. DURHAM, P. WHITTINGHAM, W.D. FRASER a J.P. VORA. Effects of growth hormone administration on bone mineral metabolism, PTH sensitivity and PTH secretory rhythm in postmenopausal women with established osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2008, ro . 23, . 5, s. 721-729.
- 72.** JOSEPH, F., B.Y. CHAN, B.H. DURHAM, A.M. AHMAD, S. VINJAMURI, J.A. GALLAGHER, J.P. VORA a W.D. FRASER. The circadian rhythm of osteoprotegerin and its association with parathyroid hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, ro . 92, . 8, s. 3230-3238.
- 73.** JUBIZ, W., J.M. CANTERBURY, E. REISS a F.H. TYLER. Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. *J Clin Invest*. 1972, ro . 51, . 8, s. 2040-2046.
- 74.** JÜPPNER, H., A.B. ABOU-SAMRA, M. FREEMAN, X.F. KONG, E. SCHIPANI, J. RICHARDS, L.F. KOLAKOWSKI Jr, J. HOCK, J.T. POTTS Jr. a H.M. KRONENBERG et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*, 1991, ro . 254, . 5034, s. 1024-1026.
- 75.** KARSDAL M.A., I. BYRJALSEN, B.J. RIIS a C. CHRISTIANSEN. Investigation of the diurnal variation in bone resorption for optimal drug delivery and efficacy in osteoporosis with oral calcitonin. *BMC Clin Pharmacol*. 2008, ro . 8, . 12.
- 76.** KAZAMA, J.J., T. OMORI, I. EI, K. EI, M. ODA, H. MARUYAMA, I. NARITA, F. GEJYO, T. SHIGEMATSU a M. FUKAGAWA. Circulating 1-84 PTH and large C-terminal PTH fragment levels in uremia. *Clin Exp Nephrol*. 2003, ro . 7, . 2, s. 144-149.
- 77.** KELLER, H. a M. KNEISSEL. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 2005, ro . 37, . 2, str. 148-158.
- 78.** KENNEL, K.A., B.L. RIGGS, S.J. ACHENBACH, A.L. OBERG a S. KHOSLA. Role of parathyroid hormone in mediating age-related changes in bone resorption in men. *Osteoporos Int*. 2003, ro . 14, . 8, s. 631-636.

- 79.** KHOSLA, S., L.J. MELTON 3rd, E.J. ATKINSON, W.M. O'FALLON, G.G. KLEE a B.L. RIGGS. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, ro . 83, . 7, s. 2266-2274.
- 80.** KILAV, R., J. SILVER a T. NAVEH-MANY. Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest.* 1995, ro . 96, . 1, s. 3276333.
- 81.** KRAJISNIK, T., P. BJÖRKLUND, R. MARSELL, O. LJUNGGREN, G. AKERSTRÖM, K.B. JONSSON, G. WESTIN a T.E. LARSSON. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol.* 2007, ro . 195, . 1, s. 1256131.
- 82.** KRAMER, I., G.G. LOOTS, A. STUDER, H. KELLER a M. KNEISSEL. Parathyroid hormone (PTH) induced bone gain is blunted in SOST overexpressing and deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2010, ro . 25, str. 1786189.
- 83.** KURO-O, M., Y. MATSUMURA, H. AIZAWA, H. KAWAGUCHI, T. SUGA, T. UTSUGI, Y. OHYAMA, M. KURABAYASHI, T. KANAME, E. KUME, H. IWASAKI, A. IIDA , T. SHIRAKI-IIDA, S. NISHIKAWA, R. NAGAI a Y.I.NABESHIMA. Mutation of the mouse klothe gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 1997, ro . 390, s. 45651.
- 84.** KUROSU, H., Y. OGAWA, M. MIYOSHI, M. YAMAMOTO, A. NANDI, K.P. ROSENBLATT, M.G. BAUM, S. SCHIAVI, M.C. HU, O.W. MOE a M. KURO-O. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klothe. *J Biol Chem.* 2006, ro . 281, . 10, s. 612066123.
- 85.** LABRECQUE, G. a P.M. BÉLANGER. Biological rhythms in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Pharmacol Ther.* 1991, ro . 52, . 1, s. 95-107.
- 86.** LAU, A.N. a J.D. ADACHI. Role of teriparatide in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2010, ro . 21, . 6, s. 497-503.
- 87.** LEDGER, G.A., M.F. BURRITT, P.C. KAO, W.M. O'FALLON, B.L. RIGGS a S. KHOSLA. Abnormalities of parathyroid hormone secretion in elderly women that are reversible by short term therapy with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, ro . 79, . 1, s. 211-216.
- 88.** LEDGER, G.A., M.F. BURRITT, P.C. KAO, W.M. O'FALLON, B.L. RIGGS a S. KHOSLA. Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, ro . 80, . 11, s. 3304-3310.

- 89.** LEAK, R.K. a R.Y. MOORE. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 2001, ro . 433, . 3, s. 312-334.
- 90.** LEMMER, B. a G. LABRECQUE. Chronopharmacology and chronotherapeutics: definitions and concepts. *Chronobiol. Int.* 1987, ro . 4, . 3, s. 319-329.
- 91.** LI, S.A., M. WATANABE, H. YAMADA, A. NAGAI, M. KINUTA a K. TAKEI. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct.* 2004, ro . 29, . 4, s. 91699.
- 92.** LIBUTTI, S.K., H.R. ALEXANDER, D.L. BARTLETT, M.L. SAMPSON, M.E. RUDDEL, M. SKARULIS, S.J. MARX, A.M. SPIEGEL, W. SIMMONDS a A.T. REMALEY. Kinetic analysis of the rapid intraoperative parathyroid hormone assay in patients during operation for hyperparathyroidism. *Surgery.* 1999, ro . 126, . 6, s. 1145-1150.
- 93.** LINDSAY, R., F. COSMAN, H. ZHOU, M.P. BOSTROM, V.W. SHEN, J.D. CRUZ, J.W. NIEVES a D.W. DEMPSTER. A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: early actions of teriparatide. *J Bone Mine Res.* 2006, ro . 21, . 3, s. 366-373.
- 94.** LINDSAY, R., H. ZHOU, F. COSMAN, J. NIEVES, D.W. DEMPSTER a A.B. HODSMAN. Effects of a one-month treatment with PTH (1-34) on bone formation on cancellous, endocortical and periosteal surfaces of the human ilium. *J Bone Miner Res.* 2007, ro . 22, . 4, s. 495-502.
- 95.** LIU, S., R. GUO, L.G. SIMPSON, Z.S. XIAO, C.E. BURNHAM a L.D. QUARLES. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem.* 2003, ro . 278, . 39, s. 374196 37426.
- 96.** LIU, S., J. ZHOU, W. TANG, X. JIANG, D.W. ROWE a L.D. QUARLES. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006, ro . 291, . 1, s. 386 49.
- 97.** LOGUE, F.C., W.D. FRASER, D.S. O'REILLY, J. CHRISTIE, D.A. CAMERON, D.C. WALLACE a G.H. BEASTALL. Sleep shift dissociates the nocturnal peaks of parathyroid hormone (1-84), nephrogenous cyclic adenosine monophosphate, and prolactin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, ro . 75, . 1, s. 25-29.
- 98.** LOGUE, F.C., W.D. FRASER, S.J. GALLACHER, D.A. CAMERON, D.S. O'REILLY, G.H. BEASTALL, U. PATEL a I.T. BOYLE. The loss of circadian rhythm for intact

- parathyroid hormone and nephrogenous cyclic AMP in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol.* 1990, ro . 32, . 4, s. 475- 483.
- 99.** LUKERT, B.P. a L.G. RAISZ . Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med.* 1990, ro . 112, . 5, s. 352-364.
- 100.** MA, Y.L., R.L. CAIN, D.L. HALLADAY, X. YANG, Q. ZENG, R.R. MILES, S. CHANDRASEKHAR, T.J. MARTIN a J.E. ONYIA. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001, ro . 142, . 9, s. 4047- 4054.
- 101.** MAGLIOLA, L. a L.R. FORTE. Prolactin stimulation of parathyroid hormone secretion in bovineparathyroid cells. *Am J Physiol.* 1984, ro . 247, s. 675- 680.
- 102.** MARUANI, G., A. HERTIG, M. PAILLARD a P. HOUILLIER. Normocalcemic primary hyperparathyroidism: evidence for a generalized target-tissue resistance to parathyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab..* 2003, ro . 88, . 10, s. 4641-4648.
- 103.** MAURAS, N. Can growth hormone counteract the catabolic effects of steroids? *Horm Res.* 2009, ro . 72, Suppl 1, s. 48-54
- 104.** MAZZIOTTI, G., V. CIMINO, E. DE MENIS, S. BONADONNA, G. BUGARI, L. DE MARINIS, J.D. VELDHUIS a A. GIUSTINA. Active acromegaly enhances spontaneous parathyroid hormone pulsatility. *Metabolism.* 2006, ro . 55, . 6, s. 736-740.
- 105.** MAZZUOLI, G., D. MARINUCCI, E. D'ERASMO, M. ACCA, D. PISANI, M.G. RINALDI, G. BIANCHI, D. DIACINTI a S. MINISOLA. Cyclical behavior of bone remodeling and bone loss in healthy women after menopause: results of a prospective study. *Bone.* 2002, ro . 31, . 6, s. 718-724.
- 106.** MAZZUOLI, G., D. DIACINTI, E. D'ERASMO a M. ALFÒ. Cyclical changes of vertebral body heights and bone loss in healthy women after menopause. *Bone.* 2006, ro . 38, . 6, s. 905-910.
- 107.** MIYAMOTO, K., S. TATSUMI, K. MORITA a E. TAKEDA. Does the parathyroid òseeö phosphate? *Nephrol Dial Transplant.* 1998, ro . 13, . 11, s. 2727-2729.
- 108.** MORSE, D. a P. SASSONE-CORSI. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci.* 2002, ro . 25, . 12, s. 632-637.
- 109.** MOSEKILDE, L. a M.S. CHRISTENSEN. Decreased parathyroid function in hyperthyroidism: interrelationships between serum parathyroid hormone, calcium-phosphorus metabolism and thyroid function. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1977, ro . 84, . 3, s. 566-575.

- 110.** MOSEKILDE, L. Primary hyperparathyroidism and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008, ro .69, . 1, str. 1-19. *Endocrinol (Oxf)*. 2008, ro .69, . 1, str. 1-19.
- 111.** MOUTSATSOU, P., E. KASSI a A.G. PAPAVALASSILOU. Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends Mol Med*. 2012,ro . 18, . 6, s. 348-359.
- 112.** MURRAY, T.M., L.G. RAO, P. DIVIETI a F.R. BRINGHURST. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl- terminal ligands. *Endocr Rev*. 2005, ro . 26, . 1, s. 78-113.
- 113.** NAGOSHI, E., C. SAINI, C. BAUER, T. LAROCHE, F. NAEF a U. SCHIBLER. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*. 2004, ro . 119, . 5, s. 693-705.
- 114.** NEER, R.M., C.D. ARNAUD, J.R. ZANCHETTA, R. PRINCE, G.A. GAICH, J.Y. REGINSTER, A.B. HODSMAN, E.F. ERIKSEN, S. ISH-SHALOM, H.K. GENANT, O. WANG a B.H. MITLAK. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2004, ro . 344, . 19, s. 1434-1441.
- 115.** NGUYEN-YAMAMOTO, L., L. ROUSSEAU, J.H. BROSSARD, R. LEPAGE, P. GAO, T. CANTOR a P. D'AMOUR. Origin of parathyroid hormone (PTH) fragments detected by intact-PTH assays. *Eur J Endocrinol*. 2002, ro . 147, . 1, s. 123-131.
- 116.** NIELSEN, H.K., K. BRIXEN, M. KASSEM, S.E. CHRISTENSEN a L. MOSEKILDE. Diurnal rhythm in serum osteocalcin: relation with sleep, growth hormone, and PTH(1-84). *Calcified Tissue International*. 1991, ro . 49, . 6, s. 373-377.
- 117.** NIELSEN, H.K., K. BRIXEN, M. KASSEM, P. CHARLES a L. MOSEKILDE. Inhibition of the morning cortisol peak abolishes the expected morning decrease in serum osteocalcin in normal males: evidence of a controlling effect of serum cortisol on the circadian rhythm in serum osteocalcin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1992, ro . 74, . 6, s. 1410-1414.
- 118.** NIELSEN, H.K. Circadian and circatrigintan changes in osteoblastic activity assessed by serum osteocalcin. Physiological and methodological aspects. *Dan Med Bull*. 1994, ro . 41, . 2, s. 216-227.
- 119.** NIELSEN, P.K., U. FELDT-RASMUSEN a K. OLGAARD. A direct effect of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant*. 1996, ro . 11, . 9, s. 1762-1768.

- 120.** OBERMAYER-PIETSCH, B.M., F. MARIN, E.V. MCCLOSKEY, P. HADJI, J. FARRERONS, S. BOONEN, M. AUDRAN, C. BARKER, A.D. ANASTASILAKIS, W.D. FRASER, T. NICKELSEN a EUROFORS Investigators. Effects of two years of daily teriparatide treatment on BMD in postmenopausal women with severe osteoporosis with and without prior antiresorptive treatment. *J Bone Miner Res.* 2008, ro . 23, . 10, s. 1591-1600.
- 121.** O'BRIEN, C.A., D. JIA, L.I. PLOTKIN, T. BELLIDO, C.C. POWERS, S.A. STEWART, S.C. MANOLAGAS a R.S. WEINSTEIN. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology.* 2004, ro . 145, . 4, s. 1835-1841.
- 122.** O'BRIEN, C.A., L.I. PLOTKIN, C. GALLI, J.J. GOELLNER, A.R. GORTAZAR, M.R. ALLEN, A.G. ROBLING, M. BOUXSEIN, E. SCHIPANI, C.H. TURNER, R.L. JILKA, R.S. WEINSTEIN, S.C. MANOLAGAS a T. BELLIDO. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One.* 2008, ro . 13, . 3, s. 2942.
- 123.** OHDO, S., S. KOYANAGI, H. SUYAMA, S. HIGUCHI a H. ARAMAKI. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med.* 2001, ro . 7, . 3, s. 356-360.
- 124.** ONYIA, J.E., R.R. MILES, X. YANG, D.L. HALLADAY, J. HALE, A. GLASEBROOK, D. MCCLURE, G. SENO, L. CHURGAY, S. CHANDRASEKHAR a T.J. MARTIN. In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2000, ro . 15, . 5, s. 863-871.
- 125.** ORWOLL, E.S., W.H. SCHEELE, S. PAUL, S. ADAMI, U. SYVERSEN, A. DIEZ-PEREZ, J.M. KAUFMAN, A.D. CLANCY a G.A. GAICH. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone(1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2003, ro . 18, . 1, s. 9-17.
- 126.** OXLUND, H., G. ORTOFT, J.S. THOMSEN, C.C. DANIELSEN, C. EJERSTED a T.T. ANDREASSEN. The anabolic effect of PTH on bone is attenuated by simultaneous glucocorticoid treatment. *Bone.* 2006, ro . 39, . 2, s. 244-252.
- 127.** PACHECO-PANTOJA, E.L., L.R. RANGANATH, J.A. GALLAGHER, P.J. WILSON a W.D. FRASER. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol.* 2011, ro . 29, s. 11-12.

- 128.** PARFITT, A.M. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1982, ro . 4, . 1, s. 1-6.
- 129.** PASCHALIS, E.P., E.V. GLASS, D.W. DONLEY a E.F. ERIKSEN. Bone mineral and collagen quality in iliac crest biopsies of patients given teriparatide: new results from the fracture prevention trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, ro . 90, . 8, s. 4644-4649.
- 130.** PIERROZ, D.D., N. BONNET, P.A. BALDOCK, M.S. OMINSKY, M. STOLINA, P.J. KOSTENUIK a S.L. FERRARI. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *J Biol Chem.* 2010, ro . 285, . 36, s. 28164-28173.
- 131.** PINES, M., A.E. ADAMS, S. STUECKLE, R. BESSALLE, V. RASHTI-BEHAR, M. CHOREV, M. ROSENBLATT a L.J. SUVA. Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a C-terminal human PTH peptide. 1994, ro . 135, . 4, s. 1713-1716.
- 132.** PITTENDRIGH, C.S. a S. Daan. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. *J comp Physiol.* 1976, ro . 106, . 3, s. 2916331.
- 133.** PODBESEK R, EDOUARD C, MEUNIER PJ, PARSONS JA, REEVE J, STEVENSON RW, ZANELLI JM. Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds. *Endocrinology.* 1983, ro . 112, . 3, s. 1000-1006.
- 134.** POWELL, W.F. Jr, K.J. BARRY, I. TULUM I, T. KOBAYASHI, S.E. HARRIS, F.R. BRINGHURST a P.D. PAJEVIC. Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. *J Endocrinol.* 2011, ro . 209, . 1, str. 21-32.
- 135.** QVIST, P., S. CHRISTGAU, B.J. PEDERSEN, A. SCHLEMMER a C. CHRISTIANSEN. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone.* 2002, ro . 31, . 1, s. 57-61.
- 136.** RAPURI, P.B., H.K. KINYAMU, J.C. GALLAGHER a V. HAYNATZKA. Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers, and bone mineral density in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, ro . 87, . 5, s. 2024-2032

- 137.** RAYMOND, J.P., R. ISAAC, R.E. MERCERON a F. WAHBE. Comparison between the plasma concentrations of prolactin and parathyroid hormone in normal subjects and in patients with hyperparathyroidism or hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982, ro . 55, . 6, s. 1222-1225.
- 138.** REINBERG, A. Advances in human chronopharmacology. *Chronobiologia.* 1976, ro . 3, . 2, s. 151-166.
- 139.** RELÓGIO, A., P.O. WESTERMARK, T. WALLACH, K. SCHELLENBERG, A. KRAMER a H. HERZEL. Tuning the mammalian circadian clock: robust synergy of two loops. *PLoS Comput Biol.* 2011, ro . 12, . 7, s. 1002309.
- 140.** REPPERT, S.M. a D.R. WEAVER. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology.* 2001, ro . 63, s. 647-676.
- 141.** REPPERT, S.M. a D.R. WEAVER. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Nature.* 2002, ro . 418, s. 9356941.
- 142.** ROSENBLATT, M., G.V. SEGRE, G.W. TREGGAR, G.L. SHEPARD, G.A. TYLER a J.T. POTTS Jr. Human parathyroid hormone: synthesis and chemical, biological, and immunological evaluation of the carboxyl-terminal region. *Endocrinology.* 1978, ro . 103, . 3, s. 978-984.
- 143.** TREGGAR, G.W., J. VAN RIETSCHOTEN, E. GREENE, H.T. KEUTMANN, H.D. NIALL, B. REIT, J.A. PARSONS a J.T. POTTS Jr. Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. *Endocrinology.* 1973, ro . 93, . 6, s. 1349-1353.
- 144.** TUREK, F.W. a R. ALLADA. Liver has rhythm. *Hepatolog.* 2002, ro . 35, . 4, s. 743-745.
- 145.** SAMADFAM, R., C. RICHARD, L. NGUYEN-YAMAMOTO, I. BOLIVAR a D. GOLTZMAN. Bone formation regulates circulating concentrations of fibroblast growth factor 23. *Endocrinology.* 2009, ro . 150, . 11, s. 4835-4845.
- 146.** SANTAMARIA, R., Y. ALMADEN, A. FELSENFELD, A. MARTIN-MALO, P. GAO, T. CANTOR, P. ALJAMA a M. RODRIGUEZ. Dynamics of PTH secretion in hemodialysis patients as determined by the intact and whole PTH assays. *Kidney Int.* 2003, ro . 64, . 5, s. 1867-1873.
- 147.** SCILLITANI, A., V. GUARNIERI, C. BATTISTA, I. CHIODINI, A.S. SALCUNI, S. MINISOLA, C.M. FRANCUCCI a V. CARNEVALE. Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments: biologic effects. *J Endocrinol Invest.* 2011, ro . 34, (Suppl 7), s. 23-26.

- 148.** SHIMADA, T., S. MIZUTANI, T. MUTO, T. YONEYA, R. HINO, S. TAKEDA, Y. TAKEUCHI, T. FUJITA, S. FUKUMOTO a T. YAMASHITA. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, ro . 98, . 11, s. 650066505.
- 149.** SILVERBERG, S.J. a J.P. BILEZIKIAN. Parathyroid function and responsiveness in osteoporosis. In: The parathyroids. Basic and clinical concepts. Second edition. Academic press, 2001, s. 843-851.
- 150.** SILVERBERG, S.J., E. SHANE, L. DE LA CRUZ, G.V. SEGRE, T.L. CLEMENS a J.P. BILEZIKIAN. Abnormalities in parathyroid hormone secretion and 1,25-dihydroxyvitamin D3 formation in women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 1989, ro . 320, . 5, s. 277-281.
- 151.** SCHIBLER, U. a P. SASSONE-CORSI. A web of circadian pacemakers. *Cell*. 2002, ro . 111, . 7., s. 919-922.
- 152.** SCHLEMMER, A., C. HASSAGER, P. ALEXANDERSEN, C. FLEDELIUS, B.J. PEDERSEN, I.O. KRISTENSEN a C. CHRISTIANSEN. Circadian variation in bone resorption is not related to serum cortisol. *Bone*. 1997, ro . 21, . 1, s. 83-88.
- 153.** SCHLEMMER, A., P. RAVN, C. HASSAGER a C. CHRISTIANSEN. Morning or evening administration of nasal calcitonin? Effects on biochemical markers of bone turnover. *Bone*. 1997, ro . 20, . 1, s. 63-67.
- 154.** SCHLEMMER, A. a C. HASSAGER: Acute fasting diminishes the circadian rhythm of biochemical markers of bone resorption. *Eur J Endocrinol*. 1999, ro . 140, . 4, s. 332-337.
- 155.** SCHMITT, C.P., S. LÖCKEN, O. MEHLS, J.D. VELDHUIS, T. LEHNERT, E. RITZ a F. SCHAEFER. PTH pulsatility but not calcium sensitivity is restored after total parathyroidectomy with heterotopic autotransplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2003, ro . 14, . 2, s. 4076414.
- 156.** SCHMITT, C.P., J. OBRY, R. FENEBERG, J.D. VELDHUIS, O. MEHLS, E. RITZ a F. SCHAEFER. Beta 1-adrenergic blockade augments pulsatile PTH secretion in humans. *J Am Soc Nephrol*. 2003, ro . 14, . 12, s. 325-350.
- 157.** SCHMITT, C.P., M. HÖMME a F. SCHAEFER. Structural organization and biological relevance of oscillatory parathyroid hormone secretion. *Pediatr Nephrol*. 2005, ro . 20, . 3, s. 346-351.
- 158.** TARQUINI, R., G. MAZZOCOLI, S. DOLENTI, P. GAUDIANO, C. COMUNI, G. LAFFI, F. PERFETTO, K. OTSUKA, G. CORNÉLISSEN a F. HALBERG.

Circasemidian rather than circadian variation of circulating osteoprotegerin in clinical health. *Biomed Pharmacother.* 2005, ro . 59, (Suppl 1), s. 225-228.

- 159.** TATSUMI, S., H. SEGAWA, K. MORITA, H. HAGA, T. KOUUDA, H. YAMAMOTO, Y. INOUE, T. NII, K. KATAI, Y. TAKETANI, K. MIYAMOTO a E. TAKEDA. Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology.* 1998, ro . 139, . 4, s. 1692-1699.
- 160.** THAKKER, R.V. Diseases associated with the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium.* 2004, ro . 35, . 3, s. 275-282.
- 161.** TOMMASI, M., A. BROCCHI, A. BENUCCI, G. MANCA, D. BORRELLI, P. CICCHI a G. CAPPELLI. Intraoperative fall in plasma levels of intact parathyroid hormone in patients undergoing parathyroid adenectomy. *Int J Biol Markers.* 1995, ro . 10, . 4, s. 206-210.
- 162.** URAKAWA, I., Y. YAMAZAKI, T. SHIMADA, K. IJIMA, H. HASEGAWA, K. OKAWA, T. FUJITA, S. FUKUMOTO a T. YAMASHITA. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006, ro . 444, . 7120, s. 7706-774.
- 163.** VAN BEZOOIJEN, R.L., B.A. ROELEN, A. VISSER, L. VAN DER WEE-PALS, E. DE WILT, M. KARPERIEN, H. HAMERSMA, S.E. PAPAPOULOS, P. TEN DIJKE a C.W. LÖWIK. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004, ro . 199, . 6, str. 805-814.
- 164.** VERGÉLY, N., M.H. LAFAGE-PROUST, A. CAILLOT-AUGUSSEAU, L. MILLOT, F. LANG a B. ESTOUR. Hypercorticism blunts circadian variations of osteocalcin regardless of nutritional status. *Bone.* 2002, ro . 30, . 2, s. 428-435.
- 165.** VERVLOET, M.G., F.J. VAN ITTERSUM, R.M. BÜTTLER, A.C. HEIJBOER, M.A. BLANKENSTEIN a P.M. TER WEE. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011, ro . 6, . 2, s. 383-389.
- 166.** VILJAKAINEN, H.T., A. PALSSA, M. KÄRKKÄINEN, J. JAKOBSEN, K.D. CASHMAN, C. MØLGAARD a C. LAMBERG-ALLARDT. A seasonal variation of calcitropic hormones, bone turnover and bone mineral density in early and mid-puberty girls - a cross-sectional study. *Br J Nutr.* 2006, ro . 96, . 1, s. 124-130.

- 167.** VINCENT, A., B.L. RIGGS, E.J. ATKINSON, A.L. OBERG a S. KHOSLA. Effect of estrogen replacement therapy on parathyroid hormone secretion in elderly postmenopausal women. *Menopause*. 2003, ro . 10, . 2, s. 165-171.
- 168.** VILARDAGA, J.P., I. LIN a R.A. NISSENSON. Analysis of parathyroid hormone (PTH)/secretin receptor chimeras differentiates the role of functional domains in the pth/ pth-related peptide (PTHrP) receptor on hormone binding and receptor activation. *Mol Endocrinol*. 2001,ro . 15, . 7, s. 1186-1199.
- 169.** WALSH, J.S. a D.B. HENRIKSEN. Feeding and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010, ro . 503, . 1, s. 11-9.
- 170.** WEAVER, D.R. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms*. 1998, ro . 13, . 2, s. 100-112.
- 171.** WICHERS, M., E. SCHMIDT, F. BIDLINGMAIER a D. KLINGMÜLLER. Diurnal rhythm of CrossLaps in human serum. *Clinical Chemistry*, 1999, ro . 45, . 10, s. 1858-1860.
- 172.** WHITE, K.E., G. CARN, B. LORENZ-DEPIEREUX, A. BENET-PAGES, T.M. STROM a M.J. ECONS. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int*. 2001, ro . 60, . 6, s. 207962086.
- 173.** WHITE, H.D., A.M. AHMAD, B.H. DURHAM, A. PATWALA, P. WHITTINGHAM, W.D. FRASER a J.P. VORA. Growth hormone replacement is important for the restoration of parathyroid hormone sensitivity and improvement in bone metabolism in older adult growth hormone-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, ro . 90, . 6, s. 3371-3380.
- 174.** WHITE, H.D., A.M. AHMAD, B.H. DURHAM, S. CHANDRAN, A. PATWALA, W.D. FRASER a J.P. VORA. Effect of active acromegaly and its treatment on parathyroid circadian rhythmicity and parathyroid target-organ sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006, ro . 91, . 3, s. 913-919.
- 175.** WHITE, H.D., A.M. AHMAD, B.H. DURHAM, A.A. JOSHI, W.D. FRASER a J.P. VORA. Effect of oral phosphate and alendronate on bone mineral density when given as adjunctive therapy to growth hormone replacement in adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011, ro . 96, . 3, s. 726-736.
- 176.** WORTLEY, K.E., K. GARCIA, H. OKAMOTO, K. THABET, K.D. ANDERSON, V. SHEN, J.P. HERMAN, D. VALENZUELA, G.D. YANCOPOULOS, M.H. TSCHÖP, A. MURPHY a M.W. SLEEMAN. Peptide YY regulates bone turnover in rodents. *Gastroenterology*. 2007, ro . 133, . 5, s. 1534-1543.

- 177.** WU, X., G. YU, H. PARKS, T. HEBERT, B.C. GOH, M.A. DIETRICH, G. PELLED, R. IZADPANAH, D. GAZIT, B.A. BUNNELL a J.M. GIMBLE. Circadian mechanisms in murine and human bone marrow mesenchymal stem cells following dexamethasone exposure. *Bone*. 2008, ro . 42, . 5, s. 861-870.
- 178.** XIONG, J. a C.A. O'BRIEN. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2012, ro . 27, . 3, str. 499-505.
- 179.** YAMAZAKI, S., R. NUMANO, M. ABE, A. HIDA, R. TAKAHASHI, M. UEDA, G.D. BLOCK, Y. SAKAKI, M. MENAKER a H. TEI. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000, ro . 288, . 5466, s. 682-685.
- 180.** YOO, S.H., S. YAMAZAKI, P.L. LOWREY, K. SHIMOMURA, C.H. KO, E.D. BUHR, S.M. SIEPKA, H.K. HONG, W.J. OH, O.J. YOO, M. MENAKER a J.S. TAKAHASHI. PERIOD2:LUCIFERASE realtime reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, ro . 101, . 15, s. 5339-5346.
- 181.** YU, X., O.A. IBRAHIMI, R. GOETZ, F. ZHANG, S.I. DAVIS, H.J. GARRINGER, R.J. LINHARDT, D.M. ORNITZ, M. MOHAMMADI a K.E. WHITE. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology*, 2005, ro . 146, . 11, s. 4647-4656.
- 182.** ZAIDI, M., V.S. SHANKAR, O.A. ADEBANJO, F.A., LAI, M. PAZIANAS, G. SUNAVALA, A.I. SPIELMAN a B.R. RIFKIN. Regulation of extracellular calcium sensing in rat osteoclasts by femtomolar calcitonin concentrations. *Am J Physiol*. 1996, ro . 271, s. 637-644.
- 183.** ZHANG, Z., S. SUN, S.J. QUINN, E.M. BROWN a M. BAI. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem*, 2001, ro . 276, . 7, s. 5316-5322.
- 184.** ZVONIC, S., A.A. PTITSYN, G. KILROY, X. WU, S.A. CONRAD, L.K. SCOTT, F. GUILAK, G. PELLED, D. GAZIT a J.M. GIMBLE. Circadian oscillation of gene expression in murine calvarial bone. *J Bone Miner Res*, 2007, ro . 22, . 3, s. 357-365.

8 Seznam vlastních publikací autora

Publikace se vztahem k tématu disertace s IF:

1. LUCHAVOVA, M., V. ZIKAN, D. MICHALSKA, I. RASKA Jr., A. A. KUBENA a J. J. STEPAN. The effect of timing of teriparatide treatment on the circadian rhythm of bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Eur J Endocrinol*. 2011, ro . 164, . 4, s. 643-648. **IF 3,482**
2. MICHALSKA, D., M. LUCHAVOVA ,V. ZIKAN , I RASKA Jr, A. A. KUBENA a J. J. STEPAN. Effects of morning vs. evening teriparatide injection on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2012 Mar 17, [Epub ahead of print] **IF 4,859**

Publikace bez IF se vztahem k tématu disertaci:

LUCHAVOVÁ, M. a V. ZIKÁN. The parathyroid hormone circadian rhythm and its role in bone metabolism. *Osteologický Bulletin*. 2010, . 3, s. 95-100

Publikace bez vztahu k tématu disertace s IF:

ZIKÁN, V., M. TÝBLOVÁ, I. RA^TKA Jr, E. HAVRDOVÁ, M. LUCHAVOVÁ, D. MICHALSKÁ a A.A. KUB NA. Bone mineral density and body composition in men with multiple sclerosis chronically treated with low-dose glucocorticoids. *Physiol Res*. 2012 Jun 6. [Epub ahead of print] **IF 1,646**

Publikace bez vztahu k tématu disertace bez IF:

LUCHAVOVÁ, M. A I. RA^TKA Jr. Novinky a možnosti prevence a lé by osteoporózy v ambulanci praktického léka e. *Medicina Pro Praxi*. 2010, ro . 7, . 12, s. 455-460.

Ocen ní:

1. cena v Sout fli o nejlepší práci z oboru Klinická farmakologie uve ejn nou v r. 2011.

LUCHAVOVA, M., V. ZIKAN, D. MICHALSKA, I. RASKA Jr., A. A. KUBENA a J. J. STEPAN. The effect of timing of teriparatide treatment on the circadian rhythm of bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Eur J Endocrinol.* 2011, ro . 164, . 4, s. 643-648.
IF 3,482

Prezentace na kongresech a sympoziích:

1. Postgraduální seminář Endokrinologického ústavu. **LUCHAVOVÁ, M.** Kvalita kostí ovlivněná parathormonem. 31. 3. 2008
2. XIII. Celostátní konference sekundární osteoporóza v Plzni. **LUCHAVOVÁ, M.** Cushingův syndrom a kost. 18. - 19. 4. 2008
3. IX. Studentská a dědečká konference 1. LF UK. **LUCHAVOVÁ, M.** a D. MICHALSKÁ. Heterogenita v odpovědi skeletu na léčbu teriparatidem u žen s postmenopauzální osteoporózou. 21. 5. 2008
4. XXVII. Dny mladých internistů v Martine. **LUCHAVOVÁ, M., D. MICHALSKÁ** a V. Zikán. Heterogenita v odpovědi skeletu na léčbu teriparatidom u žen s postmenopauzální osteoporózou. 22- 23. 5. 2008
5. XI. Mezinárodní kongres českých slovenských osteologů v Piešťanech. **LUCHAVOVÁ, M.** a V. ZIKÁN. Cyklické změny kostní denzity u zdravých žen po menopauze. 9. 10. 2008
6. XXVIII. Dny mladých internistů v Olomouci. **LUCHAVOVÁ, M., V. ZIKÁN, I. RASKA Jr.** a D. MICHALSKÁ. Denní doba aplikace teriparatidu významně moduluje cirkadiánní rytmus kostní resorpce a kalcémie. 4-5. 6. 2009
7. XXXII. Endokrinologické dny v českém Krumlově. **LUCHAVOVÁ, M.** Hyperkortisolismus a kost. 24. 9. 2009

8. XII Mezinárodní kongres českých slovenských osteologů v Ostravě. **LUCHAVOVÁ, M., I. RAŠKA JR., D. MICHALSKÁ a V. ZIKÁN.** Denní doba aplikace teriparatidu moduluje cirkadiánní rytmus kostní resorpce. 2. 10. 2009
9. XI. Studentská a dekádní konference. **LUCHAVOVÁ, M., I. RAŠKA JR., D. MICHALSKÁ a V. ZIKÁN.** Cirkadiánní rytmus parathormonu a kostní remodelace: implikace pro léčbu osteoporózy teriparatidem (PTH 1-34). 19. 5. 2010
10. X. Celostátní konference sekundární osteoporóza v Plzni. **LUCHAVOVÁ, M., D. MICHALSKÁ, I. RAŠKA JR. a V. ZIKÁN.** Omezená schopnost chůze významně přispívá k úbytku kostní denzity v proximálním femuru u pacientů s roztroušenou sklerózou substituovaných vitaminem D a vápníkem nebo léčených risedronátem. 16. 4. 2012
11. ECTS 36th European Symposium on Calcified Tissues, 2009, Vienna. **MICHALSKA, D., V. ZIKAN, M. LUCHAVOVA a J. J. STEPAN.** Changes of bone turnover markers after 6 months treatment with either morning or evening teriparatide administration in women with severe postmenopausal osteoporosis. 24. 5. 2009, P458
12. European Congress of Endocrinology 2010, Praha. **LUCHAVOVA, M., I. RASKA JR., D. MICHALSKA a V. ZIKAN.** The circadian rhythm of bone resorption: comparison between patients treated with teriparatide and patients with primary hyperparathyroidism. 24-28. 4. 2010, Endocrine Abstracts (2010) 22 P121.
13. IOF World Congress on Osteoporosis and 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Florence. **RASKA, I. JR, M. LUCHAVOVA, D. MICHALSKA a V. ZIKAN.** The effect of teriparatide treatment on bone remodeling markers and 1,25-dihydroxy vitamin D₃. 5-8. 10.2010, WCO- ECCEO10 - ABS-1412
14. American Society for Bone and Mineral Research 2010 Annual Meeting, Toronto. **ZIKAN, V., M. TÝBLOVÁ, I. RASKA JR., E. HAVRDOVÁ, D. MICHALSKÁ a M. LUCHAVOVÁ.** Body Composition and Bone Mineral Density in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Low Dose Glucocorticoids. 15-19. 10. 2010.

9 Přílohy

Seznam příloh: 1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace.
2. Závazné prohlášení.