

UDK 616.71-007.23-076
616.71-007.23-073

Biopsija i histomorfometrija kosti u dijagnostici osteoporoze i metaboličkih bolesti kosti

Bone biopsy and histomorphometry as a tool for diagnosis of osteoporosis and other metabolic bone diseases

Sanja Zoričić Cvek¹

SAŽETAK. Osteoporoza je sistemska bolest skeleta karakterizirana redukcijom koštane mase i poremećajem unutrašnje arhitekture koštanog tkiva, što dovodi do povećane fragilnosti kostiju i sklonosti prijelomima. Prema WHO, glavni dijagnostički kriterij za osteoporozu je BMD za lumbalni dio kralježnice i femur više od 2,5 SD ispod normalne vrijednosti koštane mase referentne za određenu starosnu dob. Statistički izvještaji govore da je danas u Hrvatskoj oko 250.000 žena oboljelo od osteoporoze. Prema službenim smjernicama za dijagnostiku, prevenciju i liječenje osteoporoze u RH, u dijagnostici osteoporoze, pored denzitometrije, rendgenograma torako-lumbalne kralježnice te laboratorijskih pokazatelja pregradnje kosti, preporučuje se i biopsija kosti s histomorfometrijom. Cilj je ovog rada uputiti na metodu koštane biopsije i histomorfometrije i njenu vrijednost u dijagnostici, ali i praćenju liječenja metaboličkih bolesti kostiju i osteoporoze.

Ključne riječi: biopsija kosti, histomorfometrija, metaboličke bolesti kosti, osteoporoza

ABSTRACT. Osteoporosis is systemic skeletal disease characterised by reduction of bone mass as well as disruption of internal architecture of the osseous tissue which leads to increased bone fragility and tendency for fracture. According to WHO the primary diagnostic criteria for osteoporosis is BMD more than 2,5 SD below normal values of bone mass referral for certain age, measured on lumbar spine and femoral bone. Over 250.000 women are diagnosed with osteoporosis in Croatia. According to guidance for osteoporosis diagnosis, prevention and treatment, except for bone densitometry, X-rays of thoraco-lumbar spine and biochemical markers of bone remodeling, bone biopsy and histomorphometry are suggested. The aim of this paper is to describe bone biopsy and histomorphometry as a valuable method for diagnostics and follow up in metabolic bone diseases and osteoporosis.

Key words: bone biopsy, histomorphometry, metabolic bone disease and osteoporosis.

¹ Zavod za anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 12. 5. 2008.
Prihvaćeno: 11. 8. 2008.

Adresa za dopisivanje:
Doc. dr. sc. Sanja Zoričić Cvek, dr. med.,
Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: sanja@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Osteoporoza je sistemska bolest skeleta žena u postmenopauzi (postmenopauzalna osteoporoza), starih žena i muškaraca (senilna osteoporoza) te poremećaj metabolizma i arhitekture kosti nastao tijekom nekog drugog kliničkog stanja ili bolesti kao što su kronična renalna insuficijencija, tireotoksikoza, hiperparatiroidizam, diabetes melitus, te stanja nakon dugotrajne primjene kortikosteroida (sekundarna osteoporoza). Koštano

Prema smjernicama za dijagnostiku, prevenciju i liječenje osteoporoze (3. hrvatski kongres o osteoporozi, Šibenik, 2005.) u dijagnostici osteoporoze se, pored denzitometrije, rendgenograma torako-lumbalne kralježnice te laboratorijskih pokazatelja pregradnje kosti, dodatno preporučuje biopsija kosti s histomorfometrijom.

tkivo je specijalizirano mineralizirano potporno tkivo koje na mikroskopskom nivou posjeduje izuzetno složenu organizaciju¹. Ovakva specifična unutrašnja arhitektura potrebna je da bi kost postigla potrebnu biomehaničku kompetenciju. Osnovne komponente koštanog tkiva su koštane stanice i međustanična tvar². Organska komponenta izgrađuje 35% međustanične tvari, a 65% čini anorganska mineralna komponenta (kalcijev fosfat u obliku kristala hidroksiapatita). Zbog velike količine mineralnog sadržaja kost je najveći rezervoar kalcija, fosfora i magnezija u organizmu. Organska komponenta koštanog matriksa sadržava kolagen i nekolagene proteine. Kolagen kosti je tipa I i čini više od 90% organske komponente koštanog matriksa. Preostalih 10% organske komponente koštanog matriksa čine nekolageni proteini među kojima su svakako najvažniji i najobilnije zastupljeni osteokalcin i osteonektin koji specifično vezuju kalcij. Ostali proteini su osteopontin, sijaloprotein i trombospodin, važni u adheziji stanica i koštanog matriksa³. Manje od 1% organske nekolagene komponente koštanog matriksa čine lokalni činitelji rasta važni u tkivnoj regulaciji koštanog metabolizma. Strukturu i metabolizam koštanog tkiva održavaju i prilagođavaju dvije osnovne vrste stanica: osteoblasti i osteo-

blasti. Osteoblasti su stanice aktivne u izgradnji koštanog tkiva dok osteoklasti svojim resorptivnim djelovanjem razaraju koštano tkivo. Djelovanje ovih dviju vrsta stanica normalno je u fiziološkoj ravnoteži. Fenotipski tri su vrste osteoblastnih stanica; osteoblasti, koštane "lining" stanice i osteociti. Osteoblasti su stanice koje izgrađuju kost⁴. Odgovorni su za produkciju osnovne koštane supstance odnosno osteoida. Prema nekim autorima, osteoblasti pridonose i koštanoj resorpciji jer proizvode različite neutralne proteaze potrebne za uklanjanje površinskog osteoida, nakon čega osteoklasti resorbiraju kost⁵. Poredani su duž slobodne koštane površine u jednom sloju kao skupina velikih (20 μ m) stanica kuboidnog oblika. Citoplazmatski izdanci nalaze se na secernirajućoj površini stanice i zadiru duboko u osteoidni matriks i u kontaktu su sa staničnim izdancima osteocita. Na ovaj način površinski osteoblasti ostvaruju međustanične komunikacije sa susjednim stanicama ukopanim u mineralizirani matriks kosti. Osteoblasti se nakon faze proizvodnje i sekrecije ukopavaju u mineralizirani matriks i nadalje se diferenciraju u osteocite ili ostaju mirni na koštanoj površini kao koštane "lining" stanice. Osteociti su najzreliji tip, odnosno terminalno diferencirani tip osteoblastne stanične linije. Ukopani su u koštani matriks i zauzimaju prostore u unutrašnjosti koštanog matriksa, međusobno povezani preko koštanih kanalića u koje su uloženi njihovi citoplazmatski izdanci. Postojanje ovih veza omogućuje komunikaciju među osteocitima i prijenos mehaničkih i metaboličkih signala. Mlađi osteociti sličniji su osteoblastima, dok su stariji osteociti smješteni puno dublje unutar kalcificiranog matriksa i postepeno su izgubili karakteristike aktivnih stanica, jedino im se povećavaju glikogeni depoziti. Budući da su terminalno diferencirane stanice, nemaju mogućnost diobe čak ni kada se separiraju iz matriksa. Osteociti su glavne mehanosenzorne stanice⁶. Deformacija kosti pri mehaničkom opterećenju stimulira protok intersticijske tekućine kanalima koštanog tkiva i stvara elektrokinetski potencijal koji dovodi do produkcije lokalnih medijatora koštane pregradnje⁷. U odraslih organizama glavnina koštane površine zauzeta je još jednim osteoblastnim subtipom karakterističnog fenotipa. To su tzv. koštane rub-

ne ("lining") stanice, spljoštene i duguljaste stanice. Obično se označavaju kao dio osteoplastne linije i smatra se da nastaju od osteoblasta onda kada oni prestaju sa svojom aktivnošću na onoj površini koja neće biti podvrgnuta resorpciji. Budući da imaju manje staničnih organela, smatraju se manje aktivnim stanicama. Smatra se da imaju funkciju selektivne barijere između kosti i ostalih odjeljaka ekstracelularne tekućine, tako da pridonose mineralnoj homeostazi time što reguliraju protok Ca i P koštanom ekstracelularnom tekućinom⁸. Osteoklasti su glavne, ali ne i jedine stanice koje razgrađuju kost, a podrijetlo vode od monocitno/makrofagne linije⁹. Osteoklasti su velike (100µm), multinuklearne stanice čiji kapacitet degradacije tvrdog koštanog tkiva ovisi o direktnom kontaktu s koštanim matriksom koji treba razgraditi. Stoga se obično u histološkim rezovima osteoklaste opaža kako leže u direktnom kontaktu sa slobodnom koštanom površinom, u takozvanoj resorpcijskoj Howshipova uvali¹⁰. Ova ekskavacija je, dakako, produkt njihovog resorptivnog djelovanja u razgradnji i organskog i anorganskog sadržaja kosti. Broj jezgara je u normalnim humanim osteoklastima oko 10 i s obzirom da npr. u Pagetovoj bolesti osteoklasti mogu imati i do 100 jezgara, smatra se da broj jezgara reflektira njihovu aktivnost¹¹. Jezgre su smještene u blizini antiresorptivne površine stanica. Osteoklasti su bogati lizosomskim enzimima od kojih je najobilnija tartarat rezistentna kiselina fosfataza tip V izoenzima kisele fosfataze (TRAP; za kost specifičan izoenzim kisele fosfataze). U histokemiji i biokemiji ovaj enzim služi kao marker za identifikaciju diferenciranih stanica monocito-makrofagne linije, odnosno osteoklasta i njihove osteolitičke aktivnosti, ali se koštane izoforme TRAP-a ekspimiraju i u makrofaga izoliranih iz drugih organa¹². Koštano tkivo oblikuje dva tipa koštane tvari. Kompaktna koštana tvar (*substantia compacta*) izgrađuje površne slojeve svih kosti i trupove dugih kosti i građena je od tijesno zbijenih i pravilno raspoređenih koštanih lamela. Spužvasta koštana tvar (*substantia spongiosa*) građena je od koštanih gredica koje se pružaju u raznim smjerovima te čine prostornu mrežu, a među pojedinim gredicama nalaze se šupljine ispunjene crvenom koštanom srži. Gredice spužvaste koštane tvari

prostorno su raspoređene u skladu s djelovanjem sila tlaka i vlaka na kost. Raspored, broj i debljina gredica, odnosno unutrašnja arhitektura spongiozne koštane tvari ovisi o djelovanju vanjskih prvenstveno mehaničkih sila¹³.

Koštano tkivo vrlo je plastično i ima izuzetno veliku sposobnost rasta, preoblikovanja i regeneracije. Po završetku rasta (engl. *bone growth*) i oblikovanja pojedinih elemenata skeleta (engl. *bone modeling*), skelet je trajno podvrgnut preoblikovanju i pregradnji (engl. *remodeling*) ovisno

Standardni histomorfometrijski parametri (prema Američkom udruženju za istraživanje kosti i minerala) pokazatelji su kvantitete i kvalitete kosti. Prednost histomorfometrijske analize kosti je u mogućnosti analize strukture na tkivnom i staničnom nivou (statička histomorfometrija) i mogućnosti dinamičke analize metabolizma koštanog tkiva (dinamička histomorfometrija). Ova je metoda jedina koja daje cjelovit uvid u masu, strukturu i metabolizam koštanog tkiva.

o trenutačnim biomehaničkim zahtjevima i utjecajima okoliša. Cjelokupni metabolizam kosti tijekom pregradnje odvija se u ravnoteži dvaju osnovnih metaboličkih procesa; stvaranju nove koštane tvari (engl. *bone formation*) i razgradnji postojeće stare koštane tvari (engl. *bone resorption*). U normalnim uvjetima određena količina kosti koja se razgrađuje u skeletu nadomjesti se istom količinom novosintetizirane kosti i time se čuva koštana masa. Tijekom starenja ova se ravnoteža razgradnje i izgradnje nove kosti pomiče prema razgradnji, što je posljedica normalnog starenja skeleta. No u slučaju određenih bolesti i stanja, ova se ravnoteža narušava mnogo prije, a kako je to najčešće u stanjima koštanih deficita, razgradnja kosti u većoj mjeri nadmašuje novu produkciju kosti i kosti slabe u svojoj strukturi, postajući sklonije lomovima.

DIJAGNOSTIKA METABOLIČKIH BOLESTI KOSTI

Kao što je već prethodno napomenuto, prema smjernicama za dijagnostiku, prevenciju i liječenje

osteoporoze, u dijagnostici se kao zlatni standard preporuča DXA denzitometrija, odnosno mjerenje gustoće koštanog tkiva, koje ne služi samo za dijagnostiku osteoporoze, već i predviđanje rizika za nastanak prijeloma, ali i praćenje učinkovitosti liječenja osteoporoze. Osim kao jeftina, brza i jednostavna metoda, preporuča se tako i kvantitativna ultrazvučna denzitometrija, ali je manje pouzdana i koristi više kao «screening» metoda¹⁵. Također je preporučeno rendgenografsko snimanje grudne i slabinske kralježnice, ali ono nije dovoljno osjetljiva metoda, jer se gubitak koštane mase ovim snimanjem može uočiti tek kada je izgubljeno 30-50% koštane mase¹⁶. Biokemijski pokazatelji koštane pregradnje su bjelančevine ili enzimi koji nastaju za vrijeme procesa izgradnje ili razgradnje koštanog tkiva. Ove tvari mjere se u serumu i urinu. Biljezi koštane izgradnje su koštana alkalna fosfataza, osteokalcin i prokolagen tipa 1. Biljezi koštane razgradnje su razgradni produkti kolagena tipa 1, a to su deokspiridinolin (DPD) te karboksiterminalni (CTX) i aminoterminalni telopeptid kolagena tipa 1 (NTX). Povećani biljezi koštane razgradnje u krvi predviđaju rizik prijeloma neovisno o vrijednosti koštane gustoće.

Koštana biopsija i histomorfometrija važna je dijagnostička metoda. Za razliku od ostalih dijagnostičkih metoda, histomorfometrija jedina omogućava precizno proučavanje i mjerenje kosti na tkivnom i staničnom nivou. Osim toga, omogućava i mjerenje dinamike koštanog metabolizma (dinamička histomorfometrija). U istraživačke svrhe može se provesti na praktički svakom dijelu skeleta, no najčešće se provodi na trupu kralješka i proksimalnom okrajku femura. U kliničkom radu obično se provodi transilijakalna biopsija¹⁷. Ne zahtijeva ekstenzivan kirurški zahvat, a bolesnici ga obično dobro podnose. Osigurava dobivanje veće količine spongiozne kosti te obje kortikalne kosti. Uzorak kosti dobio bi se biopsijom odmah se fiksira (70% etanol, apsolutni metanol ili 10% puferirani formalin). Uzorak se po fiksaciji i dehidraciji kroz alkohole rastućih koncentracija, nedekalciniran uklapa u plastične monomere koji polimerizacijom postaju tvrdi poput same kosti, te na taj način omogućuju njeno rezanje, umanjujući mogućnost pucanja i nabiranja rezova uzoraka. Najpogodniji plastični medij za ukalapanje koštanih uzoraka je metil metakrilat¹⁸.

Mikrotomom koji je opremljen posebnim nožem za rezanje tvrdih tkiva i kosti (tungsten karbidni nož, dijamantni ili stakleni noževi) režu se serijski rezovi debljine 5 do 20 μ m i boje različitim histološkim metodama koje omogućuju vizualiziranje određenih strukturalnih elemenata koštanog tkiva. Sam postupak mjerenja određenih histomorfometrijskih parametara vodi se osnovnim zakonitostima stereometrijskih mjerenja i preduvjet je za točnost i interpretaciju rezultata histomorfometrije. To se prvenstveno odnosi na broj odabranih vidnih polja i broj histoloških rezova određenog koštanog uzorka, te njihova međusobna udaljenost koja mora biti unaprijed utvrđena¹⁹. Zatim se pristupa samom mjerenju koje se danas većinom izvodi pomoću različitih računalnih programa koji omogućuju kvantitativnu analizu mikroslike.

HISTOMORFOMETRIJSKI POKAZATELJI KOŠTANIH DEFICITA

Standardizacija i nomenklatura histomorfometrijskih parametara potječe od Američkog udruženja za proučavanje kosti i minerala (*American Society of Bone and Mineral Research*)²⁰⁻²².

Navodimo najčešće korištene statičke i dinamičke histomorfometrijske parametre. Statički histomorfometrijski parametri pokazatelji su kvantitete kosti. Ukazuju na stanje mase koštanog tkiva u određenom momentu i na određene kvalitete unutrašnje arhitekture.

Volumen kosti (engl. *bone volume, BV/TV, %*) udio je mineraliziranog i nemineraliziranog koštanog tkiva i odnosi se samo na spongioznu kost u koštanom bioptičkom uzorku. Volumen kosti glavni je histomorfometrijski pokazatelj koštane mase i ukazuje na gustoću kosti. Koštana površina (engl. *bone surface, BS/TV, mm²/mm³*) predstavlja ukupnu slobodnu površinu koštanih gredica u odnosu na ukupan volumen bioptičkog uzorka kosti bez obzira kakva je ta površina; mirna i obložena "lining" stanicama ili osteoidom, ili u resorpciji s osteoklastima u resorpcijskim lakunama, ili u aktivnoj izgradnji i obložena aktivnim osteoblastima. Ova se površina, već prema tome što ju pokriva, može izdiferencirati i izraziti kao osteoidna površina (engl. *osteoid surface, OS/BS, %*) i predstavlja udio koštane površine koji prekriva sloj osteoida deblji od 3 μ m; površina osteoblasta (engl. *osteoblast*

surface, Ob.S/BS, %) i predstavlja postotak koštane površine prekrivene jednim slojem kubičnih osteoblasta; erodirana površina (engl. *eroded surface, ES/BS, %*), udio ukupne koštane površine mineralizirane kosti na kojoj se nalaze Howshipove lakune s osteoklastima ili bez njih, s jasnim znakovima erozije i prije pojave nakupljanja osteoblasta; površina osteoklasta (engl. *osteoclast surface, Oc.S/BS, %*), dio ukupne koštane površine prekrivene osteoklastima s jasnim znacima njihovog razornog djelovanja. Osim navedenih dijelova ukupne koštane površine koja pokazuje određenu aktivnost u smislu izgradnje ili razgradnje, postoji i dio ukupne koštane površine koji ne pokazuje znakove stanične aktivnosti te se označava kao površina u mirovanju (engl. *quiescent surface, QS/BS, %*). Statički histomorfometrijski pokazatelji koji se odnose na staničnu komponentu koštanog tkiva su broj osteoklasta (engl. *osteoclast number, N.Oc./T.Ar, /mm²*), te broj osteoblasta (engl. *osteoblast number, N.Ob./T.Ar., /mm²*). Ove dvije vrste stanica mogu se posebnim histokemijskim enzimatskim bojenjima obilježiti, naime osteoklast specifično enzimatsko obilježje je enzim na tartrat otporna kiselina fosfataza (engl. *tartrat resistant acid phosphatase, TRAP*)²³, a za osteoblaste je to alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase, ALP*)²⁴, te ih na taj način sigurnije diferencirati od ostalih staničnih tipova koštanog tkiva. Unutrašnju arhitekturu biptičkog uzorka kosti može se pratiti parametrima koštanih gredica. Debljina gredica (engl. *trabecular thickness, Tb.Th., μm*), broj gredica (engl. *trabecular number, Tb.N., /mm*) i razdvojenost gredica (engl. *trabecular separation, Tb.Sp., μm*) glavni su histomorfometrijski pokazatelji i kvantitete i kvalitete trabekularne kosti. Na kraju, histomorfometrijski parametri koji ukazuju na mineralizaciju koštanog tkiva su obujam osteoida (engl. *osteoid volume, OV/BV*), udio koštanog tkiva koje nije mineralizirano te osteoidna površina (engl. *osteoid surface, OS/BS, %*) kao udio koštane površine obložene osteoidom koji ne mineralizira.

Dinamički histomorfometrijski parametri omogućuju procjenu brzine koštane pregradnje. Prije provođenja biopsije kosti potrebno je primijeniti tetraciklinsko obilježavanje kosti. Tetraciklin se tijekom mineralizacije taloži u kosti jer sa hidroksiapatitom stvara kelate. U ultraljubičastom svjetlu na-

stali kelati fluoresciraju i na taj ih je način moguće identificirati. Bitno je da se bolesniku daju dvije doze tetraciklina u razmaku od 14 dana (dvostruko tetraciklinsko obilježavanje)²⁵. Histomorfometrijski se mjeri i izračunava površina mineralizacije (engl. *mineralizing surface, MS/BS, %*) kao dio ukupne slobodne površine gredica na kojima se vrši mineralizacija, a identificira se dvostrukom tetraciklinskom oznakom. Udio mineralizacijske površine može se izraziti i u odnosu na osteoidnu površinu (*MS/OS, %*). Brzina odlaganja minerala (engl. *mineral apposition rate, MAR, μm/d*) je udaljenost dviju tetraciklinskih linija mineralizacije u odnosu na vrijeme između dvije primjene tetraciklinskog biljega (najčešće 14 dana). Brzina stvaranja kosti (engl. *bone formation rate, BFR/BS, μm³/god, BFR/BV, %/god*) pokazatelj je količine novostvorene mineralizirane kosti u određenom vremenu i može se izraziti ili u odnosu na koštanu površinu (*BFR/BS*) ili u odnosu na ukupan volumen kosti (*BFR/BV*). Ovaj je dinamički histomorfometrijski parametar najvažniji za procjenu učinkovitosti liječenja metaboličkih bolesti kostiju. Osim brzine stvaranja kosti, dinamiku koštanog metabolizma vrijedno je pratiti putem parametra vrijeme stvaranja (engl. *formation period*) koji opisuje vremenski period potreban za stvaranje nove koštane strukturne jedinice nakon resorpcije, zatim putem parametra vrijeme razgradnje (engl. *resorption period*) koji opisuje vrijeme potrebno za razgradnju određene količine koštanog tkiva. Također se može izračunati i vrijeme pregradnje (engl. *remodeling period*), te vrijeme mirovanja koštane jedinice (engl. *quiescent period*). Dijagnostička vrijednost koštane biopsije i histomorfometrije je velika. Količina kosti izmjerena drugim metodama koje se koriste u dijagnostici osteoporoze i metaboličkih bolesti kostiju, pri čemu se misli na BMD i BMC dobivene denzitometrijom pomoću DXA te pomoću ultrazvučnog mjerenja gustoće petne kosti, nije jedina determinanta mehaničke čvrstoće i jakosti kosti. Kvaliteta kosti, odnosno njena unutrašnja struktura kao što je mikroarhitektura mreže koštanih gredica spongiozne kosti, njihov položaj u odnosu na smjer djelovanja vanjskih sila tlaka i vlaka, mineraliziranost kosti i druge značajke izuzetno utječu na biomehaničku kompetenciju kosti²⁶⁻²⁸. Koštana

biopsija i histomorfometrija zasad su jedine metode koje omogućavaju njihovu analizu. Iako biopsija kosti nije uvijek potrebna za dijagnozu metaboličkog poremećaja kosti, kao ni za praćenje liječenja, ponekada je nužna u slučaju neefikasnosti liječenja kao jedina mogućnost analize stanja koštanog sustava bolesnika. I na kraju, neprocjenjiva je vrijednost histomorfometrije u eksperimentalnim studijama, naročito onima koje istražuju djelovanja novih lijekova u liječenju osteoporoze i drugih koštanih deficita.

ZAKLJUČAK

U svijetu i kod nas u Hrvatskoj sve više raste broj oboljelih, tako da osteoporoza poprima epidemijski karakter. Pored standardnih dijagnostičkih metoda (denzitometrije, rendgenogram torakolumbalne kralježnice, laboratorijski pokazatelji metabolizma kosti), koštana biopsija i histomorfometrija zauzimaju sve važnije mjesto, ne samo u dijagnostici već i u praćenju učinkovitosti liječenja osteoporoze i drugih koštanih deficita.

LITERATURA

1. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995;80:371-78.
2. Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, Boskey AL, Einhorn TA, Iannotti JP. Form and function of bone. *Orthopaedic Basic Research: Am Acad Orthop Surg* 1994;4:127-84.
3. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB Journal* 1989;3:2042-51.
4. Lian JB, Stein GS. Osteoblast biology. *In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds). Osteoporosis. San Diego, California, Academic Press Inc USA, 1996.*
5. Chambers TJ, Fuller K. Bone cell predispose bone surface to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 1985;76:155-65.
6. Mikuni-Takagaki Y, Suzuki Y, Kawase T, Saito S. Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. *Endocrinology* 1996;137:2028-35.
7. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344-58.
8. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 2002;17:77-90.
9. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclast biology. *In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds). Osteoporosis. San Diego, California: Academic Press Inc, 1996.*
10. Mundy GR. Bone resorbing cells. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. Kelseyville: American Society for Bone and Mineral Research* 1990;11-5.
11. Siris ES. Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1998;13:1061-5.
12. Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Ultrastructural localization of tartrate resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. *Am J Anat* 1991;191:228-36.
13. Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 1998;20:92-102.
14. Parfitt AM. Editorial: Quantum concept of bone remodeling and turnover implications for the pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1979;28:1-5.
15. Riekkinen O, Hakulinen MA, Toyras J, Jurvelin JS. Dual-frequency ultrasound – new pulse echo technique for bone densitometry. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:1703-8.
16. Cooper MS. Our approach to osteoporosis screening and treatment needs to change. *CMAJ* 2008;178:1683-4.
17. Faugere MC, Malluche HH. Comparison of different bone biopsy techniques for qualitative and quantitative diagnosis of metabolic bone diseases. *J Bone Joint Surg* 1983;65:1314-9.
18. Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry and immunohistochemistry. *Journal Histochem Cytochem* 1997;45:307-13.
19. Kališnik M. Temelji stereologije. *Stereološka sekcija Zveze društev anatomov Jugoslavije. Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, 1985.*
20. Parfitt AM, Drezner MC, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Min Res* 1987;2:595-610.
21. Parfitt AM, Drezner MC, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. (Summary of proposed system). *Bone* 1988;9:67-9.
22. Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols and units. *Calcif Tissue Int* 1988;42:284-6.
23. Hayman AR. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 2008;41:218-23.
24. Einhorn TA. The bone organ system: form and function. *In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. San Diego, California, Academic Press Inc USA, 1996.*
25. Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM, Davies KM, Keshawarz N, Hinders S. Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Min Res* 1988;3:133-44.
26. Chavassieux P, Arlot M, Meunier PJ. Clinical use of bone biopsy. *In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. San Diego, California: Academic Press Inc, 1996.*
27. Marcus R. The nature of osteoporosis. *In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. San Diego, California: Academic Press Inc, 1996.*
28. Seeman E. Bone quality. *Osteoporosis Int* 2003;5:3-7.