Biokemijski biljezi pregradnje kostiju - pregled
Dubravka Čvorišćec, Ivana Čepelak

Repozitorij / Repository: Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Vrsta objekta / Object type: Paper published in journal

Verzija rada / Publication status: Published version

Naslov izvornika / Source title: Biochemia Medica

Godina izdavanja / Publication year: 2009

Svezak / Volume: 19

Stranice / Pages: 17 - 35

Trajna poveznica / Permanent link: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:993813

Licencija / License: In copyright

Datum pohrane u repozitorij / Date of storage: 2020-04-10

Datum preuzimanja / Date downloaded: 2020-04-25
Biokeemijski biljezi pregradnje kostiju – pregled
Biochemical markers of bone remodeling – review

Ivana Čepelak1, Dubravka Ćorišćec2
1Zavod za medicinsku biokemijsku i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
1Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
2Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb, Zagreb
2Clinical Institute of Laboratory Diagnostic, School of Medicine, University of Zagreb and Clinical Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia

Sažetak

Danas je u upotrebi niz biokemijskih bilježaka pregradnje kostiju, uključujući bilježi izgradnje i razgradnje kostiju. Oni pružaju klinički korisne dokaze normalnih i patoloških procesa, koji odražavaju aktivnosti košteranih stanica u skeletu. Biološki bilježi pregradnje kostiju mogu se koristiti za praćenje učinaka terapije kod bolesnika s nekom od bolesti kostiju te za moguće smanjenje potrebe čestog mjerenja gustoće koštane mase (denzitometrije).

Ključne riječi: bilježi izgradnje kostiju; bilježi razgradnje kostiju; osteoporoz

Abstract

A number of biochemical markers of bone remodeling which include bone formation and bone resorption markers are currently in use. They provide clinically useful evidence of the normal and pathological processes that reflect bone cell activities in the skeleton. Biomarkers of bone remodeling can be used to document the effects of therapeutic agents in some patients with bone diseases and possibly reduce the need for frequent bone density testing.

Key words: bone formation markers; bone resorption markers; osteoporosis

Uvod

Usporedno s povećanim razumijevanjem biokemijskih procesa u kostima te izolacijom i karakterizacijom staničnih sastojaka skeletnog matriksa, povećava se i broj novih, biokemijskih potencijalnih bilježaka izgradnje i razgradnje kostiju. Općenito se dijele na:

a) enzimske bilježke izgradnje (vezane uz aktivnost osteoblasta) i razgradnje kostiju (vezane uz aktivnost osteoklasta);

b) proteine koštanog matriksa i razgradne proizvode organskoga skeletnog matriksa koji se otpuštaju u cirkulaciju za vrijeme izgradnje ili razgradnje kostiju; te

c) bilježke anorganskoga koštanog matriksa (kalcij i fosfor, koji prije svega odražavaju homeostazu kalcija/fosfora i koji u ovom pregledu neće biti razmatrani).

Introduction

Parallel with better understanding of biochemical processes in bones and isolation and characterization of cellular components of skeletal matrix, the number of new potential biochemical markers of bone formation and resorption is increasing. Generally, markers are classified into the following groups:

a) enzyme activity markers of bone formation (connected with osteoblast activity) and of bone resorption (connected with osteoclast activity);

b) bone matrix proteins and resorption products of organic skeletal matrix, which are released into circulation during bone formation and resorption; and

c) inorganic skeletal matrix markers (calcium, phosphorus which, above all, reflect calcium-phosphorus homeostasis and which will not be considered in this review).
U tablicama 1. i 2. prikazani su do sada otkriveni bilježi izgradnje i razgradnje kostiju grupine a) i b) od kojih će neki biti podrobnije razmotreni. Opisano je njihovo tkivno podrijetlo, fiziološki uzorak u kojem se mjeri njihova koncentracija/aktivnost te trenutno raspoložive analitičke metode (1,2). U tekstu će se raspravljati o bilježima na čijoj se standardizaciji više radi, odnosno onima koji su u rezultatima dosadašnjih ispitivanja pokazali veću kliničku valjanost, te naglasiti nedostatke nekih, donedavno više korištenih bilježa.

**Koje je općenito značenje biokemijskih bilježa koštane pregradnje?**

Poznata temeljna prednost biokemijskih bilježa u odnosu na mjerenje mineralnog sadržaja kosti i statičku histomorfometrijsku analizu biopsije kosti jest činjenica da njihovom uporabom dobivamo informaciju o statusu koštane pregradnje. Biokemijski su bilježi uz to i neinvazivna pretraga u usporedbi sa statičkom histomorfometrijskom analizom.

Informacija o dinamičkom stanju metabolizma kostiju mogla bi ranije ukazati na neke patološke promjene u kostima, odnosno na rizik nastanka nekih bolesti kostiju. Mjerenjem koncentracije/aktivnosti biokemijskih bilježa može se nadalje dobiti bržu informaciju o terapijskom odgovoru u odnosu na mjerenje koštane mase. Značajne promjene biokemijskih bilježa mogu se, naime, otkriti već nakon 1-3 mjeseca djelotvorne terapije, dok se promjena koštane mase može odgovarajuće procijeniti tek nakon 1. ili 2. godine (3,4). Potrebu za pronalaženjem specifičnih biokemijskih bilježa naglašava i primjena novih, vrlo

**What is the general significance of biochemical markers of bone remodeling?**

The familiar basic advantage of biochemical markers, compared with bone mineral densitometry and static histomorphometric analysis of bone biopsy, is that by using them we get the information about the status of bone remodeling. In addition, biochemical markers are non-invasive with regard to dynamic histomorphometric analysis of bone biopsy.

Information on bone remodeling status could be an early indicator of some pathological changes in bones or the risk of some bone disease. By measuring concentration/activity of biochemical markers, it is possible to gain information about therapeutic response faster than by measuring bone mass. Significant changes in biochemical markers can be discovered already after 1 to 3 months of effective therapy while bone mass changes can be adequately evaluated only after the 1st or rather the 2nd year (3,4). The need for specific biochemical markers is

| Table 1. Biljezi izgradnje kostiju | Table 1. Bone formation markers |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Marker | Tissue origin | Analytical sample | Analytical method |
| Total Alkaline Phosphatase (ALP); specific for bone formation only in patients with no liver or bile duct disease | bone, liver | serum | colorimetry |
| Bone alkaline phosphatase (B-ALP); specific osteoblast product; some procedures show cross reactivity with ALP liver isoenzyme | bone | serum | colorimetry, electrophoresis, precipitation, IRMA, EIA |
| Osteocalcin (OC, BGP); specific osteoblast product; there are several reactive forms in blood; some can NASTATI during bone resorption | bone, trombocytes | serum | RIA, ELISA, IRMA, ECLIA |
| C-terminal propeptide of type I procollagen (PICP); specific proliferating osteoblast and fibroblast product | bone, skin, soft tissues | serum | RIA, ELISA |
| N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP); specific proliferating osteoblast and fibroblast product; partially incorporated into skeletal matrix | bone, skin | serum | RIA, ELISA |

IRMA – immunoradiometric assay; EIA – enzyme immunoassay; RIA – radio immuno assay; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; ECLIA – electrochemiluminiscence immunoassay
Čepelak I, Dodig S. Bioke mički bi lje zni pre ga rad ni je ko stiju – preg led
Čepelak I, Dodig S. Biochemical markers of bone remodeling – review

**Tablica 2. Biljezi razgradnje kostiju**

| Marker | Tissue origin | Analytical sample | Analytical method |
|--------|---------------|-------------------|-------------------|
| Hydroxyproline, total and dialyzable (OH-Pro, OHP); specific for all fibrillar collagens and a part of collagen proteins, including C1q and elastin; present in newly synthesized and mature collagen | bone, skin, cartilage, soft tissues | urine | colorimetry, HPLC |
| Pyridinoline (PYD, Pyr); high concentrations in cartilage and bone collagen: not present in skin; present only in mature collagen | bone, tendon, cartilage | urine | HPLC, ELISA |
| Deoxypyridinoline (DPD, d-Pyr); high concentrations only in bone collagen: not present in cartilage or in skin; present only in mature collagen | bone, dentine | urine | HPLC, ELISA |
| Cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP); high proportion from bone collagen in type I collagen; can partly originate from newly synthesized collagen | bone, skin | serum | RIA |
| Cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen (fragments alpha-CTX, beta-CTX); in type I collagen; probably high proportion from bone collagen | all tissue containing type I collagen | urine, serum | ELISA, RIA, ECLIA |
| Cross-linked N-terminal telopeptide of type I collagen (fragments NTX); in type I collagen; big proportion from bone | all tissue containing type I collagen | urine (alpha/beta), serum (only beta) | ELISA, RIA, ICMA |
| Hydroxylysine-glycosides (Hyl-Glyc); collagens and collagen proteins; glucogalactosyl-hydroxylsine is highly represented in soft tissue collagens and C1q; galactosil-OH-Lys is highly represented in bone collagen | bone, skin, soft tissue, serum complement | urine | HPLC, ELISA |
| Bone sialoprotein (BSP); synthesized by active osteoblasts and lay in extracellular bone matrix; it seems to express osteoclast activity | bone, dentine, hypertrophic cartilage | serum | RIA, ELISA |
| Tartrat-resistant acid phosphatase (TR-ACP); osteoclasts, thrombocytes, erythrocytes | bone, blood | plasma/serum | colorimetry, RIA, ELISA |
| Free gamma carboxyglutamin acid (GLA); resulted from bone proteins (e.g. osteocalcin, matrix Gla protein) and from coagulation factor | blood, bone | serum/urine | HPLC |

HPLC – high performance liquid chromatography; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; RIA – radio immuno assay; ECLIA – electrochemiluminiscence immunoassay; ICMA – immunochemiluminometric assay

**Tablica 2. Bone resorption markers**

**učinkovitih lijekova, koji snažno djeluju na metabolizam kostiju. Zajedno s mjerenjem koštane mase pokazuju se korisnima i u prognozi bolesti. Nedvojbeno je do sada pokazano da su neki od biljega ili kombinacije biljega, navedeni u tablicama 1. i 2. korisni u populacijskim i epidemiološkim ispitivanjima te praćenju učinka antresorpcijske terapije. Međutim, s obzirom na neprestani razvoj novih, specifičnih postupaka za njihovo mjerenje, konačna procjena njihove kliničke korisnosti u obradi bolesnika još je uvijek u tijeku. Preporuke su stoga i nadalje da se maksimalna pažnja posveti pitanju trebaju li se i kako uopće koristiti biljezi, te standardizaciji predanalitičkih i analitičkih postupaka mjerenja koštanih biljega.

also emphasized by the use of new, very efficient drugs which have very strong effect on bone metabolism. Together with bone mass measurements, they are also very useful in disease prognosis. It has been shown so far without doubt that some of the markers or marker combinations presented in tables are useful in population and epidemiological studies, as well as in monitoring of anti-resorption therapy effect. However, given the continuous development of new, specific procedures for their measurement, the final assessment of their clinical usefulness in patient management is still underway. Therefore, it is still recommended to pay maximum attention to the issue of whether and how the markers are to be used and to standardization of preanalytical and analytical procedures of bone marker determination.
Na koji način treba procijeniti kliničku valjanost biljega?

Općenito, biokemičari i kliničari trebaju se upitati: koji biokemijski biljeg koštane pregradnje mjeriti, kako i kada ga mjeriti, kako prikupiti uzorak i kako interpretirati dobiveni rezultat. Važni kriteriji u kritičkoj prosudbi potrebe mjerenja nekog od biljega izgradnje ili razgradnje kostiju su:

- **Biološki čimbenici** (kao što su tkivna specifičnost, učinak promjene funkcije jetre ili bubrega na klirens biljega, biološki ritam biljega zbog standardizacije vremena uzimanja fiziološkog uzorka, imobilizacija i dr.);
- **Predanalitički čimbenici** (način pohranjivanja uzorka, odnosno vrijeme i temperatura, zamrzavanje i odmrzavanje uzorka, utjecaj antikoagulantija i dr.);
- **Analitička specifičnost i točnost** (mikroheterogenost biljega, kao npr. stupanj glikolizacije ALP, razgradnost biljega na više različitih fragmenta kao u slučaju osteokalcina, netočnost metoda zbog neusklađenih kalibracija, specifičnost protutijela i npr. inhibitori enzimskih aktivnosti);
- **Dijagnostička valjanost** (odnosno postoje li razlike između biljega s obzirom na njihovu dijagnostičku osjetljivost i specifičnost) (1,5).

U ovom kontekstu, pregled koštanih biljega koji slijedi treba čitatelju omogućiti procjenu moguće dijagnostičke vrijednosti pojedinih biljega koji su prema znanstveno-stručnoj literaturi prošli djelomičnu evaluaciju [alkalna fosfataza (engl. alkaline phosphatase, ALP); koštana alkalna fosfataza (engl. bone alkaline phosphatase, B-ALP); osteokalcin (engl. osteocalcin, OC), C-terminalni propeptid prokolagen tipa I (engl. carboxy-terminal type I procollagen propeptide, PICP), piridinolin (engl. pyridinoline, PYD) i deoksipiridinolin (engl. deoxypyridinoline, DPD), C-terminalni teplotipid kolagena (engl. C-telopeptide of type I collagen, CTX) i N-terminalni teplotipid kolagena (engl. N-telopeptide of type I collagen, NTX)] te nedostataka i ograničenja pojedinih postupaka njihova mjerenja. Neki od gore navedenih čimbenika prosudbe koštanih biljega prikazani su u tablici 3. (1,2).

**Biljezi izgradnje kostiju**

Biljezi izgradnje kostiju su izravni ili neizravni produkti ili enzimi aktivnih osteoblasta, njihova koncentracija ili aktivnost mjeri se u serumu ili plazmi i općenito imaju umjereno izraženu biološku variabilnost. Najčešće se mjeri aktivnost ukupne ALP, aktivnost ili masa B-ALP, te koncentracija OC i PICP.

**Alkalna fosfataza (ALP)**

Precizna fiziološka funkcija ALP još uvijek je nejasna, ali se pretpostavlja njena uloga u stvaranju osteoida i mineralizaciji kostiju. Fiziološki oblici kodirani su s 4 genska loku-

---

**How to evaluate the clinical validity of markers?**

Generally, biochemists and clinical specialists should ask themselves: which biochemical marker of bone remodeling to measure, how and when to measure it, how to collect the sample and how to interpret the test result. Important criteria in critical judgement on whether to measure some bone formation or bone resorption markers are the following:

- **Biological factors** (like tissue specificity, effect of change in liver or kidney function on marker clearance, biological rhythm of the marker due to standardization of physiological sampling time, immobilization, etc.);
- **Pre-analytical factors** (sample storage procedures, i.e. time and temperature, sample freezing and thawing, anticoagulant effect, etc.);
- **Analytical specificity and accuracy** (microheterogeneity of markers as, e.g., degree of ALP glycosylation, possibility of marker resorption into several different fragments as in case of OC, bias in methods due to non-harmonized calibrations, specificity of antibodies and of, e.g., enzyme activity inhibitors);
- **Diagnostic validity** (or the question of differences between markers considering their diagnostic sensitivity and specificity) (1,5).

In this context, the review of bone markers to follow should enable the reader to assess the possible diagnostic value of certain markers that have already been subjected to partial evaluation in scientific and professional literature (ALP (alkaline phosphatase), B-ALP (bone alkaline phosphatase), OC (osteocalcin), PICP (carboxy-terminal type I procollagen propeptide), PYD (pyridinoline), DPD (deoxypyridinoline), CTX (C-telopeptide of type I collagen) and NTX (N-telopeptide of type I collagen)), and to evaluate disadvantages and limitations of procedures applied to measure them. Some of the factors for judgement of bone markers listed above are shown in Table 3 (1,2).

**Bone formation markers**

Bone formation markers are direct or indirect products or enzymes of active osteoblasts, their concentration or activity is measured in serum or plasma, and generally they are characterized by moderately expressed biological variability. They most often include the measurement of total ALP activity, B-ALP activity or mass, and OC and procollagen type I propeptide concentrations.

**Alkaline phosphatase (ALP)**

Precise physiological function of ALP is still unclear, but it is assumed to play a role in osteoid formation and bone
Tablica 3. Predanalitičke i biološke značajke koštnih biljega

| Marker | Sample stability | Influenced by | Diurnal rhythm |
|--------|------------------|---------------|----------------|
| ALP    | stable < -20 ºC  | liver function| not significant|
| B-ALP  | stable < -20 ºC  | liver function| not significant|
| OC     | non stable < -80 ºC | kidney function| significant |
| PICP   | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| PINP   | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| OHP    | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| PYD    | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| DPD    | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| ICTP   | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| CTX    | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| Hyl-Glyc | stable < -20 ºC | liver function| significant |
| BSP    | stable < -20 ºC  | liver function| significant |
| TR-ACP | non stable < -80 ºC | hemolysis | not significant |
| GLA    | ?                | nutrition (K vitamin) coagulation | not significant |

ALP - Alkaline Phosphatase; B-ALP - Bone Alkaline Phosphatase; OC - Osteocalcin; PICP - C-terminal type I procollagen propeptide; PINP - N-terminal type I procollagen propeptide; OHP - Hydroxyproline; PYD - Pyridinoline; DPD - Deoxypyridinoline; ICTP - Cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen; CTX - Cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen; Hyl-Glyc - Hydroxylysine-glycosides; BSP - Bone sialoprotein; TR-ACP - Tartrat-resistant acid phosphatase; GLA - Free gamma carboxyglutamin acid.
većavaju se linearno s godinama u oba spola. Žene koje uzimaju kontraceptive imaju 13% manju aktivnost B-ALP. Nedostatak cinka i magnezija, koji je moguć kod parenteralne prehrane bez mikroelementa, smanjuje aktivnost ALP u serumu. Ukupna aktivnost ALP u serumu stabilna je 7 dana na sobnoj temperaturi. Opetovano peterostruko zamrзавanje i odzmравзванje uzorka ne utječe na aktivnost B-ALP (7).

Postupci razlikovanja i mjerenja aktivnosti/koncentracije dva najzastupljenija izoenzimskih oblika ALP (jetreni i koštani) koriste razlike fizikalno-kemijskih svojstava pojedinoæ oblika (toplinska denaturacija, elektroforeza, precipitacija, selektivna inhibicija, HPLC i imunokemijski postupci).

Imunokemijskim postupcima moguće je mjeriti masene koncentracije B-ALP uz primjenu dva monoklonalna protutijela prema B-ALP te aktivnosti nakon imunoadsorpcije na mikrotitarskim pločicama. Oba postupka pokazuju krivu reaktivnost od 14–20% s jetrenim oblikom ALP. Međutim, ustanovljeno je da u bolesnika s hepatobijarnim bolestima, B-ALP ostaje unutar referentnog intervala ako ukupna aktivnost ALP u serumu ne prelazi gornju granicu referentnog intervala više od dva puta. U precipitacijskom postupku ugljikohidratni (oligosaharidni) dio B-ALP, bogat N-acetilglukozaminom i N-acetil-neuraminskim kiselinom, precipitira s lektinima pšeničnih klića, dok jetrena ALP ne precipitira i mjeri se u supernatanu. Ovim postupkom dobivaju se lažno povećani rezultati kod bolesnika s hepatobijarnim bolestima. Naime, bilijarna ALP može biti također precipitirana s lektinom (što se spriječava dodavanjem Tritona X100 u reagens), a zbog povećane propusnosti stanica jetre glikozilirani dio jetrenog oblika ALP može biti izmijenjen. S obzirom da pririma lektina može značajno varirati od boćice do boćice, B-ALP zapravo nije uvijek precipitirana u potpunosti pa je potrebna standardizacija ovog postupka prema referentnoj metodi. Odnos aktivnosti i mase B-ALP (procijenjen precipitacijom s lektinom i s IRMA), kao i aktivacijska energija (reakcija katalizirana s B-ALP) variraju ovisno o ispitanoj skupini bolesnika, vjerojatno opet uključujući različiti stupanj glikozilacije enzimske molekule.

Postupak sekvenčne denaturacije toplinom koštanog izoenzima (56 °C) više se gotovo ne koristi. Iako su elektroforetski postupci za razdvajanje izobilka ALP na različitim nosačima robunski i zahtijevaju iskusstvo, zbog ostalih prednosti su i nadalje postupci izbora. Naime, primjenom elektroforeetskog postupka moguće je otkriti i ostale izobilke ALP te uz glavni koštani oblik i njegove varijante (otkrivajući i oblik koji nosi sidro). Kad aktivnost B-ALP prelazi 50% ukupne aktivnosti enzima u serumu, potrebna je obrada uzorka s neuminitadom koja uklanja sijalinsku kiselinu s B-ALP, ili aplicacija uzorka na drugi gel koji sadrži lektin (precipitira B-ALP). U meta-
boličkim bolestima kostiju primjenom HPLC izmjerene su tri vršne vrijednosti B-ALP (1,2,6,7). U slučajevima kada je bolest jetre isključena, ukupna aktivnost ALP ima kliničku vrijednost, odnosno daje dobru informaciju o izgradnji kosti i broju aktivnih osteoblasta. Brojnim ispitivanjima (transplantacija koštane srži, karcinom prostate s metastazama u kostima, žene u postmenopauzi, praćenje antiresorpcijske terapije i dr.) ustanovljeno je da mjerenje B-ALP ima veću diskriminirajuću vrijednost od ukupne vrijednosti ALP, čime je naglašena viša dijagnostička specifičnost mjerenja B-ALP. Može se, dakle, zaključiti da mjerenje B-ALP bolje razlikuje između „normalnog“ i „patološkog“ stanja na gornjoj granici referentnog intervala, pa tako povećava dijagnostičku specifičnost za otkrivanje bolesti kostiju. Zbog križne reaktivnosti u imunokemijskim postupcima i njihove nepreciznosti u donjoj polovini referentnog intervala, elektroforeza ostaje zlatni standard za otkrivanje smanjene koncentracije/aktivnosti B-ALP i za potvrdu povećane B-ALP u slučajevima težih bolesti jetre (6,8,9,10).

**Osteokalcin (OC)**

Osteokalcin (engl. *osteocalcin*, OC) ili koštani Gla (engl. *glutamic acid*). Gla protein glavni je nekolageni protein koštana matriksa, koji primarno sintetiziraju osteoblasti te odontoblasti i hipertrofni hondrocyti. Neznatna količina OC može se osloboditi tijekom razgradnje kostiju, što se može izmjeriti nekim metodama, stoga bi ga se moglo nazvati i biljegom koštane pregradnje. Sadrži 49 aminokiselina (5,8 kDa) od kojih su tri gama-karboksi-glutaminske kiseline (postranslacijska, o vitaminu K ovisna enzimska karboksilacija) na pozicijama 17, 21 i 24, a odgovorne su za Ca-vezujuća svojstva ovog proteina. Točna uloga ovog proteina još uvijek nije savsmjasna. Raspravlja se najviše o njegovoj ulozi u procesu mineralizacije kostiju, o ulozi glasnika za kalciutriol u razgradnji kostiju, te ulozi inhibitora leukocitne esteraze i aktivnosti faktora rasta. Poslije sinteze, koju značajno stimulira kalciutriol, otpušta se i ugrađuje u izvanstanični koštani matriks (>80%). Jedan dio (10-30%) novosintetiziranog OC otpušta se u cirklaciju gdje se njegova koncentracija može mjeriti imunokemijski (odražava, dakle, sintezu OC u osteoblastima i izgradnji kostiju). Ustanovljena je značajna heterogenost cirklirajuće frakcije OC, budući da podliježe proteolitičkom cijepanju u jetri, bubrezima, plazmi, kao i u samim kostima. Dva su glavna mjesta enzimskog cijepanja „intaktne“ molekule, a nastali poznati fragmenti u cirklaciji su fragmenti 1-19, 20-43, 44-49, 1-43 i 20-49. U naizgled zdravih osoba cirklirajuća frakcija „intaktnog“ OC prezentira samo 36% ukupnog imunoreaktivnog OC, N-terminalni/srednji regionalni fragment (1-43) 30%, a drugi fragmenti prisutni su u zanemarivim koncentracijama (1,2). Klinička su istraživanja pokazala da nedostatak vitamina K može dovesti do poremećaja karboksilacije OC, što rezultira exceeds 50% of the total enzyme activity in serum, neuraminidase-treated sample is required (it removes sialic acid from B-ALP) or sample application to other lectin containing gel (it precipitates B-ALP). In metabolic bone diseases, three B-ALP peaks were measured using HPLC (1,2,6,7). In cases when liver disease is excluded, total ALP activity has a clinical significance and provides good information about bone formation and a number of active osteoblasts. Numerous examinations (bone marrow transplantation, prostate cancer with metastases in bones, women in postmenopause, antiresorption therapy monitoring, etc.) have shown that B-ALP measurements have more important discriminating value than the value of total ALP activity, pointing out the higher diagnostic specificity of B-ALP measurements. Therefore, it can be concluded that B-ALP measurement makes clearer difference between “normal” and “pathological” states with the upper reference range values, and thus increases diagnostic specificity in bone diseases. Due to cross-reactivity in immunochemical methods and their inaccuracy in the lower half of the reference interval, electrophoresis remains the gold standard for detecting decreased B-ALP concentration/activity and for confirmation of increased B-ALP in cases of severe liver diseases (6,8,9,10).

**Osteocalcin (OC)**

Osteocalcin or bone Gla-protein (*glutamic acid*) is the main non-collagen protein of bone matrix, which is primarily synthesized by osteoblasts and odontoblasts and hypertrophic chondrocytes. Slight quantity of OC may be released during bone resorption and measured by some methods, so it could also be called a bone remodeling marker. It contains 49 aminoacids (5.8 kDa) of which there are three gamma-carboxyl glutamic acids (post-traslational, K vitamin dependent enzyme carboxylation) at positions 17, 21 and 24 and they are responsible for calcium-binding characteristics of this protein. The exact role of this protein still remains unclear. Its role in bone mineralization process is discussed, as well as its messenger role for calciutriol in bone resorption and its role as an inhibitor of leukocyte esterase and growth factor activity. After synthesis which is significantly stimulated by calciutriol, OC is secreted and incorporated in skeletal matrix (>80%). One part (10-30%) of newly synthesized OC is released into circulation where its concentration can be immunochemically measured (it reflects OC synthesis in osteoblasts and bone formation). The important heterogeneity of circulating OC fraction is determined due to the fact that it is proteolytically cleaved in liver, kidneys, plasma and bones. There are two main sites of enzymatic cleavage of “intact” molecules, and the resulting known fragments in circulation are: 1-19, 20-43, 44-49, 1-43 and 20-49. In seemingly healthy individuals, the circulating
nerazmjernim povećanjem koncentracije cirkulirajućeg oblika OC u cirkulaciji (11).
Budući da se vrlo brzo izlučuje kroz bubrege, poluživot cirkulirajućeg OC je oko 4-5 minuta (OC i njegovi fragmenti se nakupljuju i povećava im se koncentracija u serumu kada je promijenjena funkcija bubrega). Cirkulirajući OC pokazuje cirkadijali ritam s najvećim vrijednostima noću i rano ujutro i najnižim tijekom prijeponedna, a razlike su do 50%. Žene koje uzimaju oralne kontraceptive imaju 24% niže vrijednosti cirkulirajućeg OC. S druge strane, ustanovljeno je da vrijednosti OC nisu pod utjecajem menstruacijskog ciklusa ili uzimanja kalcija s hranom. Zanimljivo je da je OC jedini biljeg izgradnje kostiju čije vrijednosti pokazuju značajno povećanje nakon dužeg boravka u krevetu, što je vjerojatno zbog oslobađanja OC inkorporiranog u kostima iz mjesta razgradnje. Također su samo vrijednosti OC, dakle ne B-ALP i PICP, povećane kod osoba sa značajnom fizičkom aktivnošću. U usporedbi s B-ALP, opisane su značajne analitičke i biološke varijacije OC. Vrijednosti OC više su kod djece nego kod odraslih osoba, posebno za vrijeme razdoblja intenzivnog rasta, više su kod muškaraca nego kod žena dok su kod žena značajno više za vrijeme menopauze (2,6,11). Koncentracija cirkulirajućeg OC u uzajamnoj je vezi s gustoćom koštane mere na vratu femura (13) te je nezavisan pretkazatelj prijeloma kuka kod populacije starijih žena (14).

Koncentracija imunoreaktivnog OC u biološkim tekućinama mjeri se imunokemijskim postupcima (RIA, ELISA, IRMA, ECLIA). Trenutno rasploživi postupci mjerenja cirkulirajućeg OC razlikuju se s obzirom na princip mjerenja (kompeticijsko, immunometrijsko), izvor (poliklonska, monoklonska) i specifičnost protutijela (npr. za “intaktnu” molekulu ili različite fragmente), te izvor kalibratora (godeni/humani). Različita specifičnost protutijela za fragmente OC u ovim postupcima rezultira velikom različitošću koncentracija imunoreaktivnog OC (ovo je posebno važno u bolestima kod kojih je zapaženo nakupljanje raznih fragmenta, kao što su kronicne bolesti bubrega i Pagetova bolesti). U ispitivanjima usporedivosti postupa-ka opažena je slaba korelacija. Najčešće se rasploživim postupcima mjeri 1-43 fragment (N-terminal/MID fragment; dijelom ga mogu stvarati i aktivni osteoblasti), produkt proteolitičke razgradnje intaktnog OC. Premda se malo zna o funkciji ovog fragmenta, njegovo mjerenje dijelom uklanja problem predanaličke nestabilnosti. Zabilježen je, naime, gubitak imunoreaktivnosti već nakon 1 sata stajanja uzorka na sobnoj temperaturi. Stoga je brza obrada uzorka nakon uzorkovanja neophodna za sve trenutno raspoložive postupke. Uzorak u kojem se mjeri koncentracija OC u pravilu je serum, iako se za neke postupke može koristiti i plazma. Zbog dokazane nestabilnosti, odnosno djelovanja proteaza preporuča se uzorak odmah spremiti na led; može se dodati npr. inhibitor aprotinina, čime se stabilnost mo-
Biokemijski biljezi pregradnje kostiju – pregled

Čepelak I, Dodig S.

Biochemical markers of bone remodeling – review

Čepelak I, Dodig S.

Biochemia Medica 2009;19(1):17–35

25

Još očuvati 5 sati na sobnoj temperaturi. Serum odvojen od stanica unutar 1. sata nakon uzorkovanja može se odmah zamrznuti, ali se opetovano odmrzavanje i zamrzavanje ne preporuča. Hemoliza može utjecati na mjerenje koncentracije OC zbog povećanog otpuštanja proteaza iz eritrocita (2,7,12). Antikoagulansi (ako se koristi krvna plazma) s oksalatima i fluoridima mogu smanjiti koncentraciju OC. Pretpostavlja se da razlog tome nije interferencija u imunokemijskom postupku, nego veća hemoliza koju uzrokuju ovi antikoagulansi u odnosu na druge. Nadalje je ustanovljeno da stabilnost OC ovisi izrazito o analitičkoj specifičnosti primijenjenog postupka. Immunometrijska mjerenja specifično mjere intaktni OC, koji je sklon brzoj proteoličkoj razgradnji u serumu. Ovim postupcima izmjerene su niže vrijednosti (10%) OC 1-49 i OC 1-43 za vrijeme pohranjivanja 7 dana na +4°C.

Povećane vrijednosti OC opisane su u bolesnika s povećanom izgradnjom kostiju - hiperparatiroidizam, Pagetova bolest, značajna osteoporozna pregradnja, hipertiroidizam, bubrežna osteodistrofija, frakture i akromegalija. U žena u kasnijoj postmenopausalnoj fazi isto dijagnosticno značenje ima mjerenje OC 1-49 i omjera OC 1-49/OC 1-43. Zanimljivo je da je u bolesnika s osteoporozom korelacija OC i B-ALP niska, dok u primarnom hipertiroidizmu koncentracije OC i B-ALP pokazuju usporedivu diskriminiranju vrijednosti (9). Kod bolesnika s tumorom i metastazama u kostima i onih s Pagetovom bolešću, mjerenje OC manje je važno od mjerenja B-ALP u smislu dijagnosticke osjetljivosti. Suprotno tome, mjerenje OC je značajnije od mjerenja B-ALP u praćenju bolesnika na kortikosteroidnoj terapiji. Kod bolesnika s kroničnim bolestima bubrežne korisnost OC je znatno smanjena, jer je pod utjecajem funkcije bubrega. Smanjene vrijednosti OC nađene su u hipertiroidizmu, hipertiroidizmu, nedostatku hormona rasta, za vrijeme nadomjesne estrogenske terapije, te terapije s glukokortikoidima, bifosfonatima i kalcitonom. U tablici 4. prikazana su klinička stanja povezana s promjenama B-ALP i OC u serumu. Za odgovarajuće tušačenje podataka koncentracije OC važno je temelji li se primijenjeni mjerni postupak ili ne na reakciji s fragmentima OC otpuštenima iz koštana matriksa za vrijeme razgradnje. Samo u slučaju izostanka reakcije s navedenim fragmentima opravdano je tražiti optožljivo mjerenje biljega izgradnje kostiju (OC 1-43) je fragment koji se vjerojatno ne otpušta iz kosti za vrijeme razgradnje, već samo iz novosintetiziranog OC). Mjerenje specifičnog fragmenta OC obećava budući da su određivanja intaktnih molekule podložnija preanalitičkoj nestabilnosti.

Propeptidi prokolagena tipa I (PINP, PICP)

Kolagen tipa I je glavni protein koštana matriksa (> 90% sadržaja matriksa) u manjoj mjeri kože, dentina, tetha, korneje i brojnih drugih tkiva. Sintetizira se u osteoblastima u obliku prethodničke molekule prokolagena I ko-
čepelak i, dodig s. bio ke ški bi lije zi preg rad nje kos ti ju – preg led
čepelak i, dodig s. bioche mi cal mar ke rs of bo ne re mo de li ng – re view

ja sadrži N- i C-terminalnu trimernu produženu domenu [dva identična polipeptidna lancna (alfa1 I) i jedan (alfa2 I)] poznatu kao propeptid (PINP i PICP). Karakteristike dva navedena propeptida prikazane su u tablici 5. (1). Prokolagen je stoga 50% duža molekula od konačnog proteina, a njegova funkcija je sprječavanje prijevremene agregacije molekule kolagen u fibrale unutar stanice. Prije sazrijevanja kolagenskih fibrila, ovi tzv. C- i N-propeptidi cijepaju se s prokolagena tipa I specifičnim izvanstaničnim tkivnim endopeptidazama. C-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PICP) je glikoprotein koji sadrži dva polipeptidnja lancna (alfa1 I) od 246 i jedan polipeptidni la-

| Condition                               | B-ALP | OC  |
|-----------------------------------------|-------|-----|
| Paget’s disease                         | +++   | ++  |
| Primary hyperparathyreoidism            | ++    | ++  |
| Osteomalacy and rickets                 | ++    | +   |
| Chronical kidney diseases, with he-modalization | +     | ++  |
| Osteoporosis                            | +     | +   |
| Metastatic carcinoma                    | ++    | ++  |
| Hyperthyroidism                         | +     | +   |
| Chronic liver diseases                  | +     | +   |
| Familial hyperphosphatasemia           | +     |    |
| Chusing’s syndrome                      | +     | +   |
| Gaucher’s disease                       | +     | +   |

**Decrease**

| Condition                               | B-ALP | OC  |
|-----------------------------------------|-------|-----|
| Hypothyroidism                          | -     | -   |
| Familial hypophosphatasia               | -     |    |

(+ to ++++) = relative increase; (-) decrease

**Type I propeptid procollagen (PINP, PICP)**

Type I collagen is the main protein of bone matrix (>90% matrix content) and to a lesser extent of skin, dentine, tendon, cornea and other tissues. It is synthesized in osteoblasts as a precursor of procollagen I that contains N- and C-terminal trimeric extended domain [two identical polypeptide chains (alpha1 I) and one (alpha2 I)] known as bone during resorption, but only from a newly synthesized OC. The measurement of specific OC fragment is more promising since intact molecule determinations are subject to preanalytic instability.

**Table 5. Comparison of propeptide type I procollagen**

| PINP   | PICP                           |
|--------|-------------------------------|
| **Location** | aminoterminal          | carboxyterminal          |
| **Molecular mass (kDa)** | 70                           | 115                        |
| **Form** | extended                    | globular                  |
| **Chemical nature** | phosphorylated            | glycoprotein, contains mannose-rich oligosaccharides |
| **Crosslinked bonds** | non-covalent              | disulphide                |
nac (alfa2 I) od 247 aminokiselinskih ostataka, s među- i unutarstaničnim disulfidnim vezama (115 kDa) (1,6,12,15). Ugljikohidratna komponenta C-terminalnog propeptida sadrži ostatke N-acetilglukozamina i manože. PICP se metabolizira preko manoza-6-P receptora na endotelnim stanicama jetre (poluživot 6-8 minuta), a PINP pomoću receptora čistača. Svaka disfunkcija jetre može rezultirati promjenom jetrenog klirensa PICP, odnosno povećanim koncentracijama u cirkulaciji. Suprotno tome, djelovanje prougalnih citokina, koji reguliraju endocitozu preko sinusoidealnih stanica, može rezultirati smanjenim vrijednosti ma PICP. Opisan je također značajan genetski utjecaj na vrijednosti PICP, zatim diurnalnim ritam s amplitudom od 20% (veće vrijednosti noću i niže u popodnevnim satima) i relativna stabilnost u uzorku (15 dana na +4 °C, nekoli ko mjeseci na -20 °C). PICP nije, dakle, ugrađen u košteni matriks, ali se otpušta u cirkulaciji gdje se može odrediti raznim imunokemijskim postupcima (RIA, ELISA). Smatra se da je stvaranje PICP u drugim tkivima puno sporije, pa se podrazumijeva da malo pridonosi cirkularučem poolu, iako ovaj podatak nije svasim javan.

U primarnom hiperparatiroidizmu su vrijednosti PICP unutar granica vrijednosti zdravih osoba (dok su npr. vrijednosti ALP i OC povećane). Kod bolesnika s osteomalciom koji su primali vitamin D zabilježene su povećane vrijednosti kao i nakon paratiroeidektomije. Smanjene vrijednosti PICP zabilježene su u bolesnika s osteogenesis imperfecta te u osoba na glukokortikoidnoj terapiji (1,2). Općenito, temeljem ispitivanja na raznim kliničkim modelima čini se da je PICP manje osjetljiv i specifičan od B-ALP i OC zbog relativne nespecifičnosti za kost i različitog klirensa.

**Biljezi razgradnje kostiju**

Osim TR-ACP (engl. tartrate-resistant acid phosphatase, tartarat rezistentna kisel fosfataza), biljezi razgradnje su razgradni produkti koštanog kolagenja. Kako se izlučuju mokraćom, donedavno su se i određivali uglavnom u mokraću, uzorku uz koji je vezana značajna varijabilnost rezultata. Stoga je glavni znanstveni i komercijalni interes usmjeren na postavljanje i procjenu postupaka za njihovo mjerenje u serumu.

**Poprečne veze kolagenja**

Serijom intra- i intermolekularnih kovalentnih veza (poprečnih veza), između terminalnog nehezalognog dijela jedne molekule kolagenja i hezalognog dijela druge molekule kolagenja, u koštanom se matriksu stabilizira molekula zrelog kolagena tipa I. Poprečne veze, u obliku 3-hidroksipiridinskog prstena, nastaju deaminacijom ε-aminoskupine lizina ili hidroksilizina, uz katalitičko djelovanje enzyma lizil-oksidaze. Dvije su nereducibilne poprečne veze identificirane u mokraću ljudi: deoksipiridinolin (en-

**Bone resorption markers**

Aside from TR-ACP (tartrate-resistant acid phosphatase), bone resorption markers are resorption products of bone collagen. As they are secreted in urine, they were mostly measured in urine until recently; however, samples had significant test result variability. Therefore, the main scientific and commercial interest has been focused on setting up and evaluating methods for their measuring in serum.
gl. deoxypyridinoline, DPD) koji nastaje reakcijom pokrajnjih lanaca dvije molekule hidrokseilizina i jedne molekule lizina, te piridinolin,engl. pyridinoline, PYD) koji nastaje reakcijom pokrajnjih lanaca tri molekule hidrokseilizina (oba spoja posjeduju prirodnu imunogenost i fluorescenciju) (2,6,7,12,16). DPD je nađen većinom u kostima, manje u dentinu, dok je PYD lokaliziran u kolagenskim fibrilama kosti i hrihavice te u manjoj mjeri u drugim tkivima (tetive, ligamenti, stjenke krvnih žila). Budući da kost ima najjintenzivniju pregradnju, smatra se da je najvažniji izvor DPD i PYD. Kada se matriks kolagena proteolički razgrađuje, obje vrste poprečnih veza otpuštaju se u cirkulaciju, a budući da su male molekulske mase, izlučuju se mokraćem gdje im se može mjeriti koncentracija. Oba tipa poprečnih veza izlučuju se kao slobodni (40%) i peptidno vezani (60%) aminokiselinski derivati. Opisani su neki biološki čimbenici koji mogu utjecati na vrijednosti DPD i PYD: cirkadijan ritam naznačava maksimalne vrijednosti između 5 i 8 sati, a minimalne između 17 i 20 sati; menopauza, osteopenija ili duži boravak u krevetu nemaju utjecaja na vrijednosti; praćenjem u periodu od 15 mjeseci zabilježena je intrindividualna varijabilnost između 20 i 30%; kod muškaraca je visok linear odnos između starosne dobi i izlučivanja ovih spojeva mokraćem, dok kod žena takoj ovisnosti nije zabilježena; za vrijeme trudnoće povećava se vrijednost oko 91% od prvog trimestra do poroda. DPD se smatra specifičnijim biljegom razgradnjom, budući da nastaje za vrijeme sazrijevanja kolagena (ne biosinteze, dakle pojavljuje se samo kao razgradni produkt zrelog matriksa), ne metabolizira se prije izlučivanja u mokraći. Njegov je glavni izvor kosti i ne apsorbira se iz hrane (1,2,16,17).

Metode za mjerenje koncentracije DPD i PYD su HPLC i fluorometrijsko kvantificiranje te imunokemijski postupci. S ELISA tehnikom je moguće specifično mjeriti slobodni, neveznani i na peptid vezani oblik DPD. Tako dobivene vrijednosti DPD i PYD pokazuju visoku korelaciju (R > 0,95) s vrijednostima dobivenim s HPLC, metodom koja se smatra zlatnim standardom. Kako uzorak preporuča se druga jutarna mokraća (između 8 i 10 sati) poslije 12-satnog posta. Izlaganjem uzorka UV svjetlu dolazi do brz razgradnje (t 1/2 < 30 sekundi) obje poprečne veze, dok normalno dnevno svjetlo ne pokazuje tako izrazit učinak. Stabilnost biljega na -20 °C je 10-20 godina. Nije zabilježen niti značajniji pad vrijednosti ako se uzorcima spreme na temperaturu nižu od 20 °C u periodu od 6 tjedana. Opetovano zamrzavanje i odmrzavanje uzorka ne utječe na vrijednosti DPD i PYD. U tablici 6. prikazane su prednosti i nedostatci poprečnih veza kolagena kao biljega razgradnje kostiju.

Bolesnici s neliječenim primarnim hiperparatiroidizmom pokazuju značajno povećane koncentracije poprečnih veza kolagena, koje koreliraju s ukupnom aktivnošću ALP i koncentracijom PTH. Bolesnici s tumorom sa i bez me-

Collagen cross-links (PYD, DPD)

With a series of intra- and intermolecular covalent bonds (cross-links) between terminal nonhelical portion of the molecule and helical portion of a neighboring collagen molecule, a molecule of mature collagen type I is stabilized in skeletal matrix. Cross-links, as a 3-hydroxypyrindinum ring, are formed by deamination of lysine or hydroxylsine epsilon-amino group with catalytic action of enzyme lysylxoydase. There are two nonreducible cross-links identified in human urine: deoxypyrindoline (DPD) which is formed by reaction of side-chains of two hydroxylsine molecules and one lysine molecule, and pyridinoline (PYD) which is formed by reaction of side-chains of three hydroxylsine molecules (both compounds have inborn immunogenetics and fluorescence) (2,6,7,12,16). DPD is found mostly in bones, not so much in dentine, while PYD is located in bone collagen fibrils and cartilage and to a lesser extent in other tissues (tendons, ligaments, blood vessel walls). Since the bones have the most intensive remodeling, they are considered as the most important PDP and PYD source. When collagen matrix is proteolytically degraded, both cross-links are released into circulation and, due to their small mass, they are secreted by urine where they can be measured. Both types of cross-links are secreted as free (40%) and peptide-linked (60%) amino acid derivatives. Some biological factors that can influence DPD and PYD values have been described: circadian rhythm indicates maximum values between 5 and 8 a.m. and minimum between 5 and 8 p.m.; menopause, osteopenia or long-term bed rest do not affect the values; after a 15-month monitoring period, intrindividual variability between 20 and 30% has been recorded: in men the linear ratio between age and secretion of these compounds through urine is high, while such clear dependence has not been recorded in women; during pregnancy the values are elevated for about 91% comparing the first and the last trimester. DDP is considered a specific resorption marker because it is formed during collagen maturation (not during biosynthesis and therefore it appears only as a resorption product of the mature matrix), and it does not metabolize before secretion into urine. The main source of DPD is bone, and it is not absorbed from food (1,2,16,17).

DPD and DYP concentration measurement can be performed using HPLC, fluorometric quantification and immunochromal methods. With ELISA, we can specifically measure free, non-linked and peptide-linked DPD form. Thus attained DPD and DYP values show high correlation (R > 0,95) with the values measured using HPLC, a method considered a-gold standard. The second morning urine (between 8 and 10 a.m.) after a 12-hour fast is the recommended sample. Exposing the sample to the UV light causes fast resorption (half-life < 30 seconds) of both cross-links, while normal daily light does not show so...
Table 6. Prednosti i nedostatci poprečnih veza kolagena

| Advantages | Disadvantages |
|------------|---------------|
| Good correlation with bone resorption | Current available determination methods in serum are still undergoing extended clinical evaluation |
| Bone resorption indicators are released only from mature extracellular collagen | Great biological variability in urine |
| Are not metabolised | High analytical variability with one method |
| Not used again in collagen synthesis | There is no adequate reference material |
| Not under food influence (DPD) | There is no standard scheme for quality assurance |
| Hidroxiprolin (OHP) | Published data usage is problematic |

Table 6. Advantages and disadvantages of collagen cross-links

Advanatges and diadvantages of colIagen cross-links

| Advantages | Disadvantages |
|------------|---------------|
| Good correlation with bone resorption | Current available determination methods in serum are still undergoing extended clinical evaluation |
| Bone resorption indicators are released only from mature extracellular collagen | Great biological variability in urine |
| Are not metabolised | High analytical variability with one method |
| Not used again in collagen synthesis | There is no adequate reference material |
| Not under food influence (DPD) | There is no standard scheme for quality assurance |
| Hidroxiprolin (OHP) | Published data usage is problematic |

Hidroxiprolin (OHP)

S obzirom na karakteristike novijih specifičnijih biljega razgradnje kostiju, mjerjenje tradicionalno korištenoga biokemijskog biljega hidroxiprolina (engl. hydroxyproline, OHP) ne preporučuje se zbog sljedećih nedostataka: OHP je nađen i u kolagenima drugih tkiva, u C1q, elastinu i acketilokinesterazama; nije specifičan biljeg razgradnje budući da se otpušta i za vrijeme izvanstaničnog metabolizma novosintetiziranog (pro)kolagena; 90% OHP oksidacijom se metabolizira u jetri; izlučivanje OHP u mokraću izrazito je ovisno sadržaju kolagena u prehrani.

Telopeptidi kolagena tipa I (CTX, NTX)

Teorijska osnova za mjerenje telopeptidnih regija kolagena, umjesto poprečnih veza kolagena je činjenica da poprečno vezanje uvijek uključuje specifičnu domenu molekule, tzv. C- ili N-terminalni telopeptid. Kad se kolagen tipa I razgrajaosteoklastima, N- i C-terminalni telopeptidni fragmenti, još uvijek pričvršćeni poprečnim vezama ne helikalni fragment susjedne molekule, otpuštaju se u cirkulaciju i uklanjuju kroz bubrege (1,6,7,18,19). Pri tome se stvara višak razgradnih teZelorpednih produkata, budući da se cijeanje polipeptidnih lanaca može dogoditi na nekoliko mjesta unutar telopeptida. Telopeptidi mogu ili ne moraju biti poprečno vezani, može postojati nekoli-

strong effect. Marker stability at -20°C is 10-20 years. No significant value decline is recorded if samples are stored at temperature <20°C during a period of 6 weeks. Repeated sample freezing and thawing do not affect DPD and DYP values. Table 6 shows advantages and disadvantages of collagen cross-links as bone resorption markers. Patients with non-treated primary hyperparathyroidism show significantly elevated cross-link values which correlate with total ALP activity and PTH concentration. Tumor patients with and without metastases in bones can be differentiated by simultaneous B-ALP and immunoreactive PYD measurements with 0.89 accuracy (ROC analysis). Patients with D vitamin deficiency show triple increase in cross-links; PYD and DPD value comparison between premenopausal healthy women and postmenopausal (osteopenic) women shows increase in urinary cross-link secretion by up to 105%; urinary PYD is increased in 40% of patients suffering from Paget’s disease, while, e.g., total ALP activity lies within the reference interval; elevated PYD values in serum have been determined also in patients with renal osteodystrophy and correlate with histomorphometric indicators of bone resorption.

Telopeptides of type I collagens (CTX, NTX)

Theoretical basis for measuring telopeptide collagen regions, instead of collagen cross-links, is the fact that cros~s-links always involve specific molecular domain, the so-called C- or N-terminal telopeptide. During osteocla-
ko tipova poprečnog povezivanja, jedan ili više telopeptidnih lanaca može biti promijenjen beta-izomerizacijom, a i telopeptidi mogu biti već poprečno povezani na helikalnu kolagensku regiju. Za neke od razgradnih produkta postavljeni su i mjerni postupci. Postoji imunokemijski postupak za mjerenje C-terminalnog telopeptida kolagen-a (engl. C-telopeptide of type I collagen, CTX) u mokraći, točnije razgradnog produkta C-telopeptida koji koristi monoklonska protutijela protiv sintetskog oktapeptida koji sadrži poprečno vezano mjesto (Glu-Lys-Ala-His-beta-Asp-Gly-Gly-Arg), nazvano beta-CTX ili beta CrossLaps.

Koncentracije u mokraći povećane su u više od 1/3 žena u ranoj postmenopauzi. Nakon hormonske nadomjesne terapije vrijednosti se značajno smanjuju (do 61%). Moguće je i mjerenje neizomeriziranog oktapeptida u mokraći (alfa-CTX) te istodobno mjerenje alfa/beta CTX, kao indeksa pregradnje kostiju (indeks je povećan u Page tovoj bolesti, a smanjen nakon terapije s bifosfonatima). Druga metoda je imunokemijski postupak za mjerenje CTX u se- rumu koji koristi monoklonska protutijela specifična za izomerizirani oblik sekvence (EKAHD-beta-GGR) iz alfa-1 lanca humanog kolagen-a tip I (2,6,7). No, lipemican serum može interferirati u ovom postupku, pohranjivanje uzorka na sobnoj ili temperaturi od +4 °C prate smanjene vrijednosti do 13%, a opetovano zamrzavanje i odmrzava- vanje rezultira smanjenom koncentracijom (10%). Prema dosadašnjim ispitivanjima koncentracije CTX pokazuju vi- soku specifičnost (100%) i osjetljivost (83,8%) u praćenju odgovora na antiresorpcijsku terapiju (nakon 6 mjeseci više od 92% žena na antiresorpcijsku terapiju). Vrijednos- ti CTX odgovarajuće odražavaju lošu prognozu u multip- lom mijelomu, a povezane su s težim radiografskim na- kazima kod bolesnika s reumatoidnim artritismom. Visoke vrijednosti CTX povezane su s niskom koštanom masom kod bolesnika sa Crhohnovom bolesću te pokazuju viso- ku učinkovitost u dijagnozi metastaza u kostima. Komercijalno je raspoloživ i mjerni postupak za N-telopeptide frage-mente kolagen-a (engl. N-telopeptide of type I collagen, NTX). Protutijela prepozna konformacioni epitop poprečno vezanog α2-N-telopeptida s određenom sekvem- com (QYDGKGV), koja je produkt osteoklastne proteoli- ze. Opisan je cirkadijalni ritam vrijednosti, a zanimljivo je povećanje vrijednosti u zdravih žena za vrijeme folikular- nog perioda i pad za vrijeme lutealne faze. Kod žena se vrijednosti povećavaju s godinama i već su nego vrijed- nosti u odgovarajućoj dobroj grupi muškaraca. Dosadašnji rezultati pokazuju da bi ovaj biljeg mogao biti zna- čajan u procjeni razgradnje kostiju budući da izlučivanje N-terminalnog telopeptida mokraćom kod djece odraža- va razinu rasta, vrijednosti su značajno povećane kod bo- lesnica s postmenopauzalnom osteoporozom, vrijednosti- ti izlučivanja adekvatno odražavaju supresiju pregradnje kostiju pomoću estrogen-e nadomjesne terapije, kod st-mediated resorption of type I collagen N- and C-termi- nal telopeptide fragments, still attached with cross-links to the helical fragment of neighboring molecule, these are released into circulation and eliminated by kidney filtra-tion (1,6,7,18,19). Thereby is created an excess of te- lopeptide resorption products due to the following rea- sons: cleavage of polypeptide chains can occur at seve- ral sites in a telopeptide which can or does not have to be cross-linked, there can be several types of cross-link- ing, one or more telopeptide chains can be altered by beta-isomerization, and telopeptides can be cross-linked to helical collagen region. For some of these resorption products, measurement methods are available. There is an immunochemical method for measurement of C-ter- minal telopeptide in urine or, more precisely C-telopep- tide resorption product that uses monoclonal antibodies against synthetic octapeptide that has a cross-linked site (Glu-Lys-Ala-His-beta-Asp-Gly-Gly-Arg) called beta-CTX or beta CrossLaps.

Urinary concentrations are elevated in more than 1/3 of early postmenopausal women. After hormone replace- ment therapy, values decrease significantly (up to 61%). It is possible to measure nonisomerized urine octapeptide (alpha-CTX) and simultaneously to measure alpha/beta CTX as a bone remodeling index (the index is increased in Paget’s disease, and decreased after bisphosphonate ther- apy). Another method is the immunochemical method for CTX measurement in serum that uses monoclonal an- tibodies specific for isomerized sequence (EKAHD-beta-GGR) from alpha-1 chain of human type I collagen (2,6,7). However, lipemic serum can interfere with this method, the samples stored at room temperature or at +4 °C have lowered values by up to 13%, and repeated freezing gi- ves results with lower concentration (10%). According to present studies, CTX values show high specificity (100%) and sensitivity (83,8%) in monitoring the response of anti-resorption therapy (after 6 months over 92% women on anti-resorption therapy). CTX concentrations adequa-tely express bad prognoz in multiple myeloma, they are connected with more severe radiography test results in patients suffering from rheumatoid arthritis. High CTX values are related to low bone mass in patients suffering from Crohn’s disease and show high efficacy in diagno- sis of bone metastases. Methods for telopeptide N-frag- ments (NTX) are commercially available. The antibodies recognize conformational epitope of cross-linked alpha-2-N-telopeptide with a certain sequence (QYDGKVG) which is a product of osteoclastic proteolysis. Circadian rhythm is described, and it is interesting to find that there is an increased concentration during the follicular pe- riod which declines during the luteal phase in women. Al- so, concentrations increase with age and are higher than those in the respective male age group. Present results show that this marker could be significant in bone resor-
osoba koje uzimaju bifosfonate vrijednosti mokraćnog iz-
lučivanja N-terminalnog telopeptida odražavaju razgrad-
nju kostiju specifičnije nego poprečne veze kolagena.

**Tartarat-rezistentna kisela fosfataza (TR-ACP)**

Kisela fosfataza su lizozomski enzimi raznih tkiva (trom-
bociti, eritrociti, kost, prosta), koji hidroliziraju fosfomo-
noestere kod niske vrijednosti pH. U plazmi je otkriveno
5 izoenzimskih oblika enzima koji se razlikuju prema tkiv-
nom i kromosomskom podrijetlu, kao i po molekularnoj
masi te elektroforetskoj pokretljivosti. Prema elektroforet-
skoj pokretljivosti klasificiraju se kao izoenzimi 1-5, a pre-
ma osjetljivosti na inhibiciju s L(+) -tartaratom klasificiraju
se dodatno na tartarat-osjetljive i tartarat-rezistentne ob-
like (6,11,20,21,22). Mjerenje ukupne aktivnosti TR-ACP u
serumu kao biljega razgradnje kostiju ima dosta nedosta-
taka (relativno mala aktivnost, prisutnost inhibitora, nest-
abilnost kod alkalnog pH, interferencija hemolize), stoga se
ne preporuča za postavljanje dijagnoze.

TR-ACP tipa 5 stvaraju makrofagi (TR-ACP 5a; aktivnost
povećana u Gaucherovoj bolesti i lekemiji vlasastih sta-
nica) i osteoklasti (TR-ACP 5b; nema sijalinskih ostataka;
aktivnost je povećana u bolestima kostiju, posebice os-
teoPETROZI). Promjene TR-ACP tipa 5b u biti odražavaju
broj aktivnih osteoklasta.

Većinom postupaka za mjerenje aktivnosti TR-ACP nije
moguće razlikovati osteoklastni (izoforma 5b) oblik enzi-
ma od drugih oblika (izoforma 5a) koji se nalaze u plaz-
mi. Nedavno postavljena dva postupka mjerenja TR-ACP
5b u fazi su evaluacije. To su kinetički postupak mjerenja
u kojem se koristi inhibicija TR-ACP 5b s fluoridom, a TR-
ACP 5a s heparinom te imunokemijski postupak koji koris-
ti monoklonosno protutijelo za TR-ACP 5b.

Aktivnost TR-ACP povećana je kod bolesnika s različitim
oboljenjima (Tablica 7), poglavito kod metastaza u kosti-
ma. Smatra se manje vrijednim biljegom razgradnje kosti-
tiju, posebno u praćenju bolesnika s Pagetovom bolesću
koji su na terapiji bifosfonatima.

Mjerenje ukupne aktivnosti TR-ACP kao biljega razgrad-
nje kostiju trenutno se ne preporuča zbog relativno male
aktivnosti enzima i prisutnosti inhibitora u serumu, nest-
abilnosti pri alkalnom pH, činjenice da je L(+) tartarat
konkurentsni inhibitor i jake interferencije hemolize.

**Hidroksilizin-glikozidi (Hyl-Glyc)**

Galaktosil-hidroksilizin (GHL) i glukosil-galaktosil-hidroks-
ilizin (GGHL) nastaju iz lizina za vrijeme postranslacijske
faže sinteze kolagena, a otpuštaju se u cirkulaciju za vrij-
jeme razgradnje kolagena. GHL je relativno specifičniji za
razgradnju koštanog matrika nego GGHL, a nedvojeno
više specifičan od npr. OHP. Svarna prednost Hyl-Glyc
kao biljega razgradnje je u tome što se ovi oblici ne me-
taboliziraju i nisu pod utjecajem čimbenika prehrane. U
mokraći se mogu mjeriti metodom HPLC. Poželjno je pos-
ption assessment because N-terminal telopeptide in the
urine of children displays growth rate, its concentration is
significantly elevated in (female) patients with postmeno-
pausal osteoporosis, indicating an adequate suppression
of bone remodeling through estrogen supplementary
therapy. In individuals taking biphosphates, the urinary
excretion of N-terminal telopeptide is a better indicator
of bone remodeling than collagen cross-links.

**Tartarate-resistant acid phosphatase (TR-ACP)**

Acid phosphatases are lysosomal enzymes of different
tissue origin (platelets, erythrocytes, bone, prostate) that
hydrolyze phospho-monoesters at low pH value. Five
isoenzymatic forms of enzymes have been found in plas-
ma that differ regarding tissue and chromosomal origin,
as well as molecular mass and electrophoretic mobility.
By electrophoretic mobility, they are classified as isoen-
zymes 1-5, and according to sensitivity or inhibition with
L(+) -tartrate; they are furthermore classified by tarta-
rate-sensitive and tartarate-resistant forms (6,11,20,21,22).
Total TR-ACP activity measurement in serum, classified as
a bone resorption marker, has many disadvantages (rela-
tively low activity, presence of inhibitors, instability by al-
kaline pH, interference by hemolysis) and it is, therefore,
not recommended for diagnosis.

Type 5 TR-ACP is formed by macrophages (TR-ACP 5a;
activity enhanced in Gaucher’s disease and hairy cell leu-
kenia) and osteoclasts (TR-ACP 5b; non sialyl residues;
increased activity in bone diseases, especially in osteop-
orosis). Type 5b TR-ACP changes reflect a number of active
osteoclasts.

The majority of TR-ACP activity measurement metho-
ds cannot distinguish between osteoclast enzyme form
( isoform 5b ) and other forms in plasma. Two recently set
up measurement methods are being evaluated. These
are kinetic measurement procedure where TR-ACP inhi-
bition with fluoride and TR-ACP 5a with heparin is used,
and immunochemical method that uses monoclonal anti-
body for TR-ACP 5b.

TR-ACP activity is increased in patients with different di-
seases, as shown in Table 7, especially in bone metaста-
ses. It is also considered as a second class bone resorption
marker, especially in monitoring patients suffering from
Paget’s disease who received biphosphonate therapy.
Total activity measurement of TR-ACP as a bone resor-
ption marker is currently not recommendable given the
low enzyme activity and inhibitor presence in serum, in-
stability at alkaline pH, the fact that L(+) tartrate is a com-
petitive inhibitor, and strong interferential hemolysis.

**Hydroxylsine-glycosides (Hyl-Glyc)**

Galactosyl-hydroxylsine (GHL) and glucosyl-galactosyl-
hydroxylsine (GGHL) both originate from lysine during
posttranslational phase of collagen synthesis and are re-
taviti prikladan imunokemijski postupak i svakako načiniti konačnu evaluaciju kliničke vrijednosti ovog biljega (1,6,12).

Ostali proteini koštanog matriksa

Manji je broj literaturnih podataka o dva proteina matriksa koji, kako se čini, imaju određeni potencijal kao biljež pregradnje kosti. Osteonektin je sekrecijski Ca-vezjući glikoprotein koji je nađen u raznim stanicama, uključujući osteoblaste, endotelne stanice i fibroblaste. Prisutan je u aktivnim osteoblastima i mladim osteocitima (ali ne i u mironitim/tilnim osteocitima) pa se smatra pogodnim biljegom diferenciranja osteogenih stanica kosti, ukazujući na izgradnju kostiju. Međutim, budući da je prisutan i u većem broju vezivnih tkiva te u tromboцитima, smanjena je uloga kao cirkuliраuћег biljega. Koštani sialoprotein (engl. Bone Sialoprotein, BSP) je fosforilirani glikoprotein, značajno postranslacijski modificiran, a sintetiziraju ga osteoblasti i odontoblasti. Suprortno drugim fosforiliranim glikoproteinima koštanog matriksa (osteonektin), BSP je relativno ograničen na kost. Stimulira stvaranje hidroksiapatita in vitro, a pretpostavlja se da djeluje i kao stanična adhezijska molekula omogućujući stanicama (osteklastima) da se pričvrstaju na izvanstanični matriks. Za sada su raspoloživi samo preliminarni rezultati o procjeni vrijednosti ovog biljega koštane preggradnje (ELISA) kod bolesnika s ranim reumatoidnim artritom (povećana vrijednost u serumu) kao i u sinovijalnoj

leased into circulation during collagen resorption. GHL is relatively more specific for bone matrix resorption than GGHL, and without doubt more specific than, e.g., OHP. The real advantage of Hyl-Glyc as a resorption marker is the fact that these forms are not metabolized and are not affected by nutrition factors. In urine, they can be measured by HPLC. It is recommended to set up an appropriate immunochemical method and to make final evaluation of this marker for clinical significance (1,6,12).

Other bone matrix proteins

There is a small number of published scientific data about two matrix protein that seem to have certain potential as bone resorption markers. Osteonectine is secreted as Ca-binding glycoprotein found in different cells, including osteoblasts, endothelial cells and fibroblasts. It is present in active osteoblasts and young osteocytes (but not in inactive osteocytes) and therefore it is considered suitable as a marker for differentiation of osteogenetic bone cells indicating bone formation. However, due to its presence in the majority of connective tissues and in platelets, its role as a circulating marker is diminished. Bone Sialoprotein (BSP) is a phosphorylated glycoprotein, significantly posttranslationally transformed and synthesized by osteoblasts and odontoblasts. In contrast to other bone matrix phosphorylated glycoproteins (osteonectin), BSP is relatively limited to the bone. It stimulates in vitro formation of hydroxyapatite and is assumed to act as a

| Condition | TR-ACP |
|-----------|--------|
| Increase  |        |
| Metastasis carcinoma | +++ |
| Osteomalacy | ++ |
| Paget’s disease | + |
| Primary hyperparathyreoidism | ++ |
| Osteoporosis | + |
| Hyperthyreoidism | + |
| Multiple myeloma | + |
| Gaucher’s disease | ++ |
| Hair cell leukaemia | ++ |
| Decrease  |        |
| Hypothyroidism | - |

(+ to ++) = relative increase; (-) decrease

Klinička stanja povezana s promjenama aktivnosti TR-ACP

| Condition | TR-ACP |
|-----------|--------|
| Increase  |        |
| Metastasis carcinoma | +++ |
| Osteomalacy | ++ |
| Paget’s disease | + |
| Primary hyperparathyreoidism | ++ |
| Osteoporosis | + |
| Hyperthyreoidism | + |
| Multiple myeloma | + |
| Gaucher’s disease | ++ |
| Hair cell leukaemia | ++ |
| Decrease  |        |
| Hypothyroidism | - |

(+ to ++) = relative increase; (-) decrease

Tabelica 7. Klinička stanja povezana s promjenama aktivnosti TR-ACP

| Klinička stanja | TR-ACP |
|----------------|--------|
| Increase       |        |
| Metastasis carcinoma | +++ |
| Osteomalacy | ++ |
| Paget’s disease | + |
| Primary hyperparathyreoidism | ++ |
| Osteoporosis | + |
| Hyperthyreoidism | + |
| Multiple myeloma | + |
| Gaucher’s disease | ++ |
| Hair cell leukaemia | ++ |
| Decrease       |        |
| Hypothyroidism | - |

(+ to ++) = relative increase; (-) decrease
Mjerenje aktivnosti B-ALP ima prednost pred mjerenjem ukupne aktivnosti ALP zbog veće dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Imunokemijski postupci za mjerenje B-ALP pokazuju križnu reaktivnost (14-20%) s jetrenom ALP. Međutim, to ne umanjuje kliničku korisnost ovog mjerenja, osim kod bolesnika s teškim oblicima bolesti jetre.

OC je protein specifičan za kost, ali pokazuje brojne nedostatke u smislu nestabilnosti u uzorku i neusklađenosti rezultata dobivenih raznim mjernim postupcima. Međutim, u nekim situacijama (kortikosteroidna osteopenija, odsutnost razorene strukture kosti), OC može poslužiti kao osjetljivijeg kostnog pražnjenja.

Izlučivanje poprečnih vezų kolagena mokraćom dje-ločno je evaluirano u analitičkom smislu i u smislu kliničke korisnosti na temelju čega se smatra da ovaj biljeg može zamijeniti mjerenje OHP kao postupak izbora za procjenu razgradnje kosti.

Ostali razgradni produkti telopeptida kolagena tipa I (NTX, CTX) mjere se kao pokazatelji razgradnje kostiju, ali još uvijek zahtijevaju detaljnu evaluaciju, posebno u smislu njihova izvankostanog klirensa i mogućih drugih izvora izvan kosti. Njihova klinička korisnost varira ovisno o skupini bolesnika koja se ispituje.

Mjerenje aktivnosti TR-ACP ne preporučuje se za upotrebu.

U tablici 8. sažeto je prikazana dosadašnja prosudba kliničke korisnosti biljega pregradnje kostiju. Za izbor biljega pregradnje kostiju važna je mogućnost medulaboratorijske usporedivosti rezultata i dobra definicija biljega koji će se koristiti. Bitno je uspostaviti referentne intervale, standardizirati mjerne postupke, odrediti točan koncept kvalitete osiguranja, pokušati smanjiti individualnu variabilnost mjerenjem biljega u serumu, a ne u mokraći, automatizirati mjerne postupke odgovarajućom kalibracijom, te ustanoviti stabilnost ključnih reagensa.

S obzirom na zastupljenost osteoporozne u široj populaciji te vrste primijenjene antiresorpcijske terapije, IOF (engl. International Osteoporosis Foundation) 2000. godine objavila je preporuke o korištenju vrste (biljezi izgradnje kos-tiju B-ALP, OC i PINP u serumu; biljezi razgradnje kostiju NTX u mokraći, CTX u serumu i mokraći, DPD u mokraći) i broja koštanih biljega, uzorkovanju i intervalima mjerenja cell adhesion molecule, enabling cells (osteoclasts) to at-tach to extracellular matrix. Currently there are only avail-able preliminary test results on evaluation of this bone remodeling marker (ELISA) in patients suffering from the early stage of rheumatoid arthritis (elevated values in se-rum), as well as in synovial fluid of patients suffering from rheumatoid arthritis with progressed joint function disor-der (higher values were found than in patients with pre-served joint structure). Elevated concentration of circulating fractions in postmenopausal women is also noticed in comparison to reference values in pemenopausal pe-riod (1). As a good indicator of possible fracture and bo-ne mass, cathepsin K has also been mentioned, which is a cysteine protease important in the bone resorption pro cess (23,24,25).

Based on the published scientific data review, the follow-ing can be concluded:

B-ALP activity measurement has an advantage com-pared to the measurement of total ALP activity because of greater diagnostic sensitivity and specificity. Immunoc-hemical methods for B-ALP measurement show cross reactiviti (14-20%) with liver ALP. However, this does not diminish clinical efficacy of these measurements, except in patients with severe liver diseases.

OC is a bone specific protein but it shows numerous di-sadvantages like instability in the sample and differences in test results due to different measurement methods. However, in some diagnostic situations (corticosteroid osteopenia, lack of destroyed bone structure) OC can be used as a sensitive bone remodeling marker.

The urinary excretion of collagen cross-links is partly evaluatetly onalytically but, based on its clinical efficacy; it is considered that this marker can replace OHP measurement as the method of choice for bone remodeling evaluation.

Other telopeptide type I collagen resorption produc-nts (NTX, CTX) are measured as bone resorption indices; however, they demand further evaluation, especially of their extrasosseous clearance and other possible extrasosseous sources. Their clinical efficacy varies depending on which patient group is examined.

TR-ACP activity measurement is not recommended for clinical use.

Table 8 summarizes the evaluated clinical efficacy of bo-ne remodeling markers.

In order to select a bone remodeling marker, it is impor-tant to do inter-laboratory comparisons and to define the characteristics of the bone marker to be used; to estab-li-sh reference intervals, to standardize measurement meth-ods, to establish a good quality assurance program, to try to diminish individual variability by measuring marke-rs in serum and not in urine, to use automated measure-ment methods with appropriate calibration, and to test the stability of reagents.
koncentracije biljega za vrijeme terapije te graničnim vrijednostima s obzirom na procjenu rizika nastanka prijeloma i moguće malignosti. Preporuka je koristiti jedan koštani biljeg ili jedan biljeg izgradnje i jedan biljeg razgradnje kostiju, pri čemu se prednost daje mjerenju biljega u serumu. Krv treba uzeti nataše prije 9 sati; ako se biljeg mjeri u mokraći, preporuka je koristiti prvi ili drugi jutarnji uzorak mokraće. Preporuča se mjerenje biljega izgradnje kostiju prije i nakon 6 mjeseci terapije, a biljega razgradnje kostiju prije i nakon 3 ili 6 mjeseci terapije (25).

Zaključak

Zaključno treba naglasiti da je i nadalje neosporna potreba dugotrajnih longitudinalnih ispitivanja biokemijskih biljega pregradnje kostiju na velikom broju ispitanika uz korelaciju s referentnim postupkom mjerenja koštane mase. Potrebna će nadalje biti rationalizacija korištenja biljega ili kombinacije biljega za odgovarajuću bolest kostiju kako bi se uklonili oni s niskom kliničkom korisnošću. Najveći izazov za skoru budućnost je dakako kombinacija genetičkih i biokemijskih biljega u procjeni rizika osteoporozne te ostalih bolesti kostiju.

Considering the frequency of osteoporosis cases in a wider population and different types of antiresorption therapy, *International Osteoporosis Foundation* (IOF) published in 2000 some guidelines to use on various types (bone formation markers B-ALP, OC and PINP in serum; bone resorption markers NTX in urine, CTX in serum and urine, DPD in urine) and number of bone markers, sampling and measurement intervals of bone marker concentrations during therapy periods, and limiting values considering risk assessment for fracture and possible malignancy stages. These guidelines recommend the use of one bone marker or one bone formation and one bone resorption marker, with the priority given to the measurement of a marker in serum. Blood should be collected after an overnight fast, before 9 a.m.; if a marker is measured in urine, it is recommended to use 1st or 2nd morning urine sample. It is recommended to measure bone formation markers before and 6 months after therapy, and bone resorption markers before and 3 or 6 months after therapy (25).

Conclusion

To summarize, there is a need for long-lasting longitudinal studies of biochemical bone remodeling markers on a great number of individuals with correlation to reference procedures of bone mass measurement. Furthermore, rationalization in marker usage or their combination will be essential in order to eliminate those with low clinical value. Indeed, the greatest challenge of the future is the combination of genetic and biochemical markers in risk assessment of osteoporosis and other bone diseases.
Corresponding address:
Ivana Čepelak
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Domagojeva 2
10 000 Zagreb
Croatia
e-mail: icepelak@yahoo.com