

# Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego

Modern diagnostics of osteoporosis based on the use of biochemical markers of bone turnover

Natalia Drwęska-Matelska<sup>1</sup>, Hubert Wolski<sup>2,3</sup>, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz<sup>2,4</sup>, Marian Majchrzycki<sup>5</sup>, Radosław Kujawski<sup>4</sup>, Bogusław Czerny<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Zakład Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań, Polska

<sup>2</sup> Klinika Perinatologii i Chorób Kobiety, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

<sup>3</sup> Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Podhalański Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Nowy Targ, Polska

<sup>4</sup> Zakład Farmakologii i Fitochemii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań, Polska

<sup>5</sup> Katedra i Klinika Rehabilitacji Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

<sup>6</sup> Katedra Farmakologii Ogólnej i Farmakoekonomiki, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Polska

## Streszczenie

*Osteoporoza jest chorobą charakteryzującą się małą masą kostną oraz dezorganizacją wewnętrznej mikroarchitektury tkanki kostnej. Oznaczanie markerów biochemicznych umożliwia wczesne zdiagnozowanie zmian w metabolizmie tkanki kostnej. Wciąż poszukuje się markera, którego biologiczną funkcję można powiązać bezpośrednio z metabolizmem kostnym, jednoznacznie wskazując na związek pomiędzy jego stężeniem a ryzykiem złamań oraz odpowiedzią na stosowane leczenie.*

*Obecnie główne zastosowanie znajduje pomiar kolagenopochodnych markerów resorpcji kości. Są to przede wszystkim telopeptydy kolagenu typu I mające postać heliakalnych, usieciowanych fragmentów zlokalizowanych zarówno na końcu aminowym (NTX), jak i karboksylowym (CTX) cząsteczki kolagenu. Wśród markerów syntezy kości na szczególną uwagę zasługują natomiast kolagenopochodne markery kościotworzenia C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1CP) i N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1NP).*

*Jednoczesne zastosowanie markerów syntezy i resorpcji kości pozwoli na pełne zobrazowanie przeciwstawnych procesów remodelingu kostnego oraz na szerokie wykorzystanie markerów biochemicznych w diagnostyce i terapii osteoporozy.*

Słowa kluczowe: **osteoporoza / obrót kostny / markery biochemiczne /**

## Adres do korespondencji:

Natalia Drwęska-Matelska  
Zakład Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej  
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich  
Polska, 60-630 Poznań, ul. Wojska Polskiego 71b  
tel. 61/665-95-50  
e-mail: natalia.matelska@iwnirz.pl

Otrzymano: 25.02.2014  
Zaakceptowano do druku: 20.06.2014

Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

## Abstract

*Osteoporosis is a disease with low bone mass and disorganization of the internal microarchitecture of bone tissue. Determination of biochemical markers allows for early diagnosis of changes in bone tissue metabolism. The search for a marker whose biological function could be directly connected with bone metabolism, clearly indicating a connection between its concentration and risk fracture as well as response to treatment, continues.*

*Currently, measurement of collagen-derived markers of bone resorption is used in the majority of cases. They are, first of all, telopeptides of collagen type I localized on the amino end - N-terminal telopeptide of type 1 collagen (NTX), as well as on the carboxy end - C-telopeptide of type 1 collagen (CTX) of collagen molecule. Among markers of bone synthesis, special attention is paid to the procollagen type 1 carboxy-terminal propeptide (P1CP) and procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP).*

*Simultaneous application of bone synthesis and resorption markers allows for a full imaging of the bone remodeling process and application of biochemical markers in the diagnosis and therapy of osteoporosis.*

Key words: **osteoporosis / bone turnover / biochemical markers /**

## Wstęp

Osteoporoza jest chorobą metaboliczną charakteryzującą się małą masą kostną oraz dezorganizacją wewnętrznej mikroarchitektury tkanki kostnej [1]. Najpoważniejszym klinicznym objawem osteoporozy są złamania kości, a związane z nimi koszty leczenia spowodowały, że osteoporoza stała się istotnym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym. Do szczególnie niebezpiecznych należą złamania szyjki kości udowej. Aż od 20-25% osób, u których doszło do takiego złamania umiera w ciągu 1 roku po zdarzeniu, głównie w wyniku powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego wywołanych długotrwałym unieruchomieniem. Wśród tych osób mniej niż połowa powraca do sprawności sprzed złamania [2, 3, 4]. Dane WHO wskazują, że na całym świecie około 200 mln kobiet odczuwa dolegliwości związane z osteoporozą [4, 5], po menopauzie choroba rozwija się u co trzeciej kobiety [1], dodatkowo rocznie osteoporoza jest przyczyną 8,9 mln złamań u kobiet [5, 6]. W USA na osteoporozę choruje blisko 44 mln kobiet i mężczyzn [5, 7]. W UE aż 22 mln kobiet dotkniętych jest osteoporozą. W roku 2010 liczbę zgonów związanych ze skutkami złamań oszacowano na 43 tys. (50% zgonów wywołanych złamaniami szyjki kości udowej, 28% złamaniami w obrębie kręgosłupa i 22% innymi typami złamań). W Polsce rocznie odnotowuje się około 30 tys. złamań szyjki kości udowej [8].

Całkowite koszty leczenia osteoporozy na terenie UE w 2010 roku oszacowano na 37 mld Euro [5, 9]. W Wielkiej Brytanii w roku 2010 odnotowano 300 tys. złamań, a całkowity koszt związany z leczeniem złamań samej szyjki kości udowej i następczą opieką społeczną sięgnął tam 2,3 mld funtów [10]. Szacuje się, że ryzyko wystąpienia złamania u kobiety powyżej 50 roku życia jest wyższe niż ryzyko zachorowania na choroby układu krążenia czy raka piersi [11]. Niestety, większość pacjentów jest nieświadoma choroby do momentu wystąpienia pierwszego złamania.

Problem osteoporozy będzie drastycznie narastał z uwagi na wydłużenie okresu życia. Coraz większą uwagę zwraca się więc na profilaktykę osteoporozy, jak najwcześniejszą diagnostykę oraz możliwie szybkie wdrożenie skutecznego leczenia, zanim dojdzie do złamania mogącego zakończyć się trwałym kalectwem lub zgonem pacjenta. Dotychczasowym, powszechnie wykorzy-

stywanym w diagnostyce kryterium rozpoznania osteoporozy jest wskaźnik gęstości mineralnej kości (BMD – *bone mineral density*) [12]. Pomiar BMD charakteryzuje się słabą czułością i może nie wskazać rzeczywistego zagrożenia, dlatego nie powinien być jedyną metodą diagnostyczną w oszacowaniu pełnego ryzyka wystąpienia złamań w osteoporozie [13].

Prawdopodobieństwo wystąpienia złamań u pacjenta coraz częściej określa się na podstawie BMD skorygowanego korzystając z algorytmu uwzględniającego płeć, wiek, wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*), złamania w wywiadzie, wystąpienie złamań w rodzinie, drugorzędne czynniki ryzyka osteoporozy: reumatoidalne zapalenie stawów, przyjmowanie glukokortykoidów, dieta i styl życia [13, 14]. W ostatnich latach powstało wiele kalkulatorów umożliwiających oszacowanie ryzyka wystąpienia złamań w oparciu o te informacje. Jednym z nich jest FRAX (*Fracture Risk Assessment Tool*), zaproponowany przez WHO, który uwzględnia dodatkowo dane o pochodzeniu i przynależności do określonej grupy etnicznej, choć nie korzysta z biochemicznych markerów obrotu kostnego [13, 15].

Procesy kościotworzenia i resorpcji są ze sobą ściśle powiązane i u zdrowego człowieka pozostają we względnej równowadze [16]. Całokształt jednocześnie przebiegających w całym szkielecie procesów doskonale obrazują pomiary stężenia biochemicznych markerów remodelingu tkanki kostnej [17]. Stężenie markerów podlega ciągłym zmianom w zależności od statusu hormonalnego (zwłaszcza w stanów związanych z przewlekłym hypoestrogenizmem), wieku, pory roku czy nawet pory dnia [18]. Właśnie dodatkowe oznaczanie markerów biochemicznych umożliwia niekiedy bardzo wczesne zdiagnozowanie zmian na poziomie metabolizmu tkanki kostnej. Można je standardowo oznaczać w surowicy/osoczu i/lub moczu. Jednoczesne zastosowanie w testach zarówno markerów syntezy jak i resorpcji kości pozwala na zobrazowanie tempa i natężenia przeciwstawnych procesów kościotworzenia z udziałem osteoblastów i osteoklastów tkanki kostnej [17, 18].

Celem pracy jest przedstawienie nowoczesnych nieinwazyjnych metod prognozowania zmian gęstości mineralnej kości oraz skuteczności leczenia osteoporozy w oparciu o wykorzystanie oznaczeń biochemicznych markerów kościotworzenia oraz resorpcji tkanki kostnej.

Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

## Markery kościotworzenia

Najstarszymi markerami syntezy kości jest kostna frakcja alkalicznej fosfatazy (BAP – *bone-specific alkaline phosphatase*) oraz osteokalcyna (OC – *osteocalcin*). Fosfataza BAP została wprowadzona do praktyki klinicznej już w 1929 roku [19]. Do zalet tego markera należy niewielki wpływ składników pokarmowych na oznaczane wartości, stabilność w pobranych próbkach krwi, długi okres półtrwania, niska zmienność osobnicza oraz pozytywna reakcja na terapię antyresorpcyjną [20].

Niestety BAP wykazuje równie wiele wad, jak wysoka reaktywność krzyżowa z izoformami BAP pochodzącymi z wątroby [21], duża zmienność dobową, skomplikowana metodologia oznaczania [16], które częściowo ograniczają jej zastosowanie w diagnostyce osteoporozy. Osteokalcyna jest głównym niekolagenowym białkiem kości i wpływa na mineralizację osteoidu. Podczas degradacji tkanki kostnej do krwi uwalniane są jej fragmenty, dlatego sugerowano, że oznaczanie jej stężenia w surowicy i/lub osoczu będzie doskonałym narzędziem monitorowania procesu resorpcji. Niestety jak większość markerów, wykazuje istotne wady dyskwalifikujące ją z grupy markerów oznaczanych klinicznie. Do najistotniejszych wad należą duża zmienność dobową, niestabilność i krótki okres półtrwania osteokalcyny [15, 22].

Do stosunkowo nowych markerów należą również białka wydzielane przez aktywne osteoblasty, zwane markerami osteoklastogenezy: RANK/RANKL (*receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B/ligand*) i osteoprotegeryna (OPG – *osteoprotegerin*). Z uwagi na ich kluczową rolę w metabolizmie tkanki kostnej, szczególne nadzieje wiązano z oznaczaniem tych cząsteczek jako wskaźników syntezy kości. Nie spełniły one jednak wszystkich oczekiwań przede wszystkim z uwagi na problem w oznaczaniu RANKL, związany z jego występowaniem w formie związanej z błoną komórkową, formie rozpuszczalnej i dodatkowo w postaci wolnej lub związanej z OPG w surowicy, co powoduje duże trudności w diagnostyce laboratoryjnej [16]. Dodatkowo wpływ poziomu stężenia OPG i RANKL na wartość BMD nie jest jednoznaczny, dlatego nie znalazły one dotychczas szerokiego zastosowania klinicznego. Obecnie prowadzone są także badania nad ich zastosowaniem w celu poznania mechanizmu działania leków przeciwko osteoporozie [23].

Wśród markerów syntezy kości na szczególną uwagę zasługują kolagenopochodne markery kościotworzenia C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1CP – *procollagen type 1 carboxy-terminal propeptide*) i N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1NP – *procollagen type 1 amino-terminal propeptide*). W osteoblastach syntetyzowany jest prokolagen typu I zawierający na C i N końcach aminokwasy odcinane w procesie zewnątrzkomórkowego dojrzewania kolagenu. Powstające wolne fragmenty – P1CP oraz P1NP wydzielane są do krwi. Pomiar P1CP obrazuje liczbę nowopowstałych cząsteczek kolagenu typu I, charakteryzuje go jednak bardzo krótki okres półtrwania (6-8 min.), co utrudnia wykonanie analiz. Dodatkowo P1CP wykazuje dużą zmienność dobową, z maksimum przypadającym w nocy i minimum rano [16]. W przypadku P1NP obserwuje się małą zmienność dobową, niską zmienność osobniczą, stabilność w temperaturze pokojowej, a jego poziom w krążeniu nie ulega znaczącym zmianom po posiłku (badani nie muszą być na czczo). Wadą natomiast jest wysoki koszt oznaczania. Właśnie P1NP został wybrany markerem referencyjnym dla oceny syntezy kości

przez grupę roboczą Międzynarodowej Fundacji Osteoporozy. Nie jest on swoisty wyłącznie dla tkanki kostnej, lecz przyjmuje się, że zdecydowana większość tego markera powstaje podczas syntezy kolagenu typu I w trakcie procesu kościotworzenia. Dla oznaczenia P1NP opracowano sposób pobierania materiału biologicznego, postępowanie zachowujące stabilność próbki oraz metodę immunochemiczną oznaczania. Znana jest także zmienność biologiczna i analityczna tego markera. Dodatkowo na podstawie doniesień ustalono, iż P1NP jest predyktorem złamań i pozytywnie reaguje na stosowaną u pacjentów terapię, co sprawia, że jest użytecznym narzędziem monitorowania leczenia osteoporozy [24, 25].

## Markery resorpcji kości

Cechą charakterystyczną markerów resorpcji kości jest wykazywanie najwyższego stężenia wcześniej rano, wynikającego z największego nasilenia resorpcji w godzinach nocnych, co niewątpliwie należy uwzględnić podczas wykonywania testów [26]. Dodatkowo leki standardowo stosowane w leczeniu osteoporozy w odmienny sposób wpływają na poziom markerów obrotu kostnego, przez co odzwierciedlenie zmian resorpcji kości podczas terapii może być zaburzone [26].

Do najstarszych oznaczanych markerów resorpcji kości należą hydroksypolina (HYP), pirydynolina (PYD) i deoksypirydynolina (DPD). W praktyce klinicznej pomiar hydroksypoliny sprawia wiele trudności, głównie z uwagi na konieczność całodobowej zbiórki moczu pacjenta, ze szczególnym uwzględnieniem drugiej próbki porannego moczu. Konieczna jest również dodatkowa korekta wyniku w stosunku do kreatyniny [16, 27]. Z uwagi na możliwość pochodzenia hydroksypoliny z różnych tkanek w organizmie oraz fakt, że stężenie markera nie ulega zmianom podczas stosowania terapii antyresorpcyjnej, test nie jest obecnie wykonywany w praktyce klinicznej i nie ma większej wartości diagnostycznej [28].

Pirydynolina i deoksypirydynolina to aminokwasy uwalniane z usieciowanej struktury kostnej podczas degradacji kolagenu w trakcie resorpcji kości. Stężenie ich w moczu obrazuje wyłącznie resorpcję kości i degradację dojrzałych form kolagenu. Wykazują jednak wysoki stopień zmienności dobowej oraz podobnie jak hydroksypolina, ich oznaczanie wymaga całodobowej zbiórki moczu dlatego nie należą obecnie do markerów standardowo stosowanych w diagnostyce osteoporozy [15, 22].

Obecnie główne zastosowanie znajduje pomiar kolagenopochodnych markerów resorpcji kości. Są to głównie telopeptydy kolagenu typu I mające postać heliakalnych, usieciowanych fragmentów zlokalizowanych zarówno na końcu aminowym (NTX – *N-terminal telopeptide of type 1 collagen*), jak i karboksylowym (CTX – *C-telopeptide of type 1 collagen*) cząsteczki kolagenu. Mogą mieć także formę trimerycznych telopeptydów C-końcowych. NTX oraz CTX stanowią fragmenty wycięte z kolagenu typu I wskutek aktywności katepsyny K, uwalniane podczas osteoklastycznej resorpcji kości. Obecnie markery te zdobyły zdecydowaną przewagę w stosunku do wcześniej opisanych, przede wszystkim dzięki powszechnej dostępności testów. Markery te można oznaczać zarówno moczu, jak i surowicy krwi.

W przypadku pomiaru w moczu kłopotliwa pozostaje kwestia konieczności 24-godzinnej zbiórki moczu, uciążliwej dla pacjenta, choć pozwalającej na zminimalizowanie wpływu dużej zmienności dobowej czy składników pokarmowych na wynik.

Natalia Drwńska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

Markery syntezy kości	Nazwa skrókowa	Synteza / Lokalizacja / Rola w metabolizmie tkanki kostnej	Zalety	Wady	Próby	Literatura
<b>Kostna frakcja alkalicznej fosfatazy (bone alkaline phosphatase)</b>	BAP, b-alp	<b>Synteza</b> – osteoblasty <b>Lokalizacja</b> – błona cytoplazmatyczna osteoblastów; <b>Rola</b> – enzymatyczna degradacja inhibitora mineralizacji pirofosforanu w alkalicznym pH, inicjacja mineralizacji kości i/lub wpływ na wczesne etapy jej przebiegu	Niski koszt oznaczania Wysoki stopień swoistości markera Niewielki wpływ spożycia pokarmu Stabilność w próbkach krwi, brak wpływu hemolizy Długi okres półtrwania we krwi (1–2 dni) Niska zmienność osobnicza Pozytywna odpowiedź na terapię antyresorpcyjną	Wysoki poziom (20%) reaktywności krzyżowej z izoformami pochodzącymi z wątroby Duża zmienność dobową na poziomie 10% Złożona metodyka do oznaczeń Wpływ wielu czynników na wynik pomiaru, co należy uwzględnić interpretując wynik testu;	Surowica, osocze	Wheater et al., 2013 Terreni et al., 2012 Seibel et al., 2005
<b>Osteokalcyne (osteocalcin)</b>	OC	<b>Synteza</b> – osteoblasty <b>Lokalizacja</b> – macierz kostna; przyłączona do hydroksyapatytu <b>Rola</b> - wpływ na mineralizację osteoidu	Późny marker aktywności osteoblastów Swoista dla tkanki kostnej	Problemy analityczne i problem standaryzacji testu Duża zmienność dobową – na poziomie 30% Największe stężenie w nocy, z pikiem o godzinie 4 w nocy, najmniejsze rano Do krążenia trafia niewielka ilość OC, frakcja w dużym stopniu usuwana jest przez nerki - niewydolność tych organów wpływa na zawyżony wynik testu Niestabilność cząsteczki Szybko degradowana - okres półtrwania od kilkunastu minut do 1 godziny Istotne międzylaboratoryjne różnice wyników oznaczania	Surowica, osocze	Wheater et al., 2013 Seibel et al., 2005 Closs et al., 2004
<b>N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (procollagen I aminoterminal propeptide)</b>	P1NP, pINP,	<b>Synteza</b> – osteoblasty <b>Lokalizacja</b> – dodatkowe aminokwasy na N- końcu syntetyzowanej przez osteoblasty cząsteczki prokolagenu typu I, odcinane w procesie dojrzewania kolagenu dając wolne fragmenty – propeptydy	Marker syntezy nowej cząsteczki kolagenu typu I Niska zmienność osobnicza Minimalny wpływ posiłku (badania nie muszą być na czczo) Stabilność w temperaturze pokojowej Pozytywna odpowiedź na terapię antyresorpcyjną zautomatyzowana immunochemiczna metoda oznaczania Predyktor złamań	Wysokie koszty oznaczania Brak swoistości dla tkanki kostnej Zmienność dobową na poziomie 25% Krótki okres półtrwania we krwi – kilka minut	Surowica, osocze	Vasikaran et al., 2011 Kaczmarski i wsp., 2000
<b>C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (procollagen I carboxyterminal propeptide)</b>	P1CP, pCp	<b>Synteza</b> – osteoblasty <b>Lokalizacja</b> – dodatkowe aminokwasy na C- końcu cząsteczki prokolagenu typu I	Marker syntezy nowej cząsteczki kolagenu typu I Obrazuje ilość nowopowstałych cząsteczek kolagenu typu I Termostabilność	Bardzo krótki okres półtrwania (6-8 minut) utrudnia wykonanie analiz Duża zmienność dobową, z maksimum przypadającym w nocy i minimum rano Brak reakcji na zmiany związane ze stanem menopauzy	Surowica, osocze	Wheater et al., 2013 Seibel et al., 2005 Hannon et al., 2000
<b>Ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika kappa B (receptor activator for nuclear faktor kappa B ligand)</b>	RANKL	<b>Lokalizacja</b> – ligand receptora RANK na powierzchni osteoklastów i prekursorów osteoklastów <b>Rola</b> – aktywacja i stymulacja proliferacji osteoklastów	Kluczowa rola w regulacji metabolizmu tkanki kostnej; Nowy biomarker; Dostarcza informacji na temat mechanizmu działania leków przeciw osteoporozie	Problemem w oznaczaniu związany z występowaniem RANKL w kilku formach: związanej z błoną komórkową, rozpuszczalnej i dodatkowo w postaci wolnej lub związanej z OPG, sprawia utrudnienia analityczne Niejednoznaczny wpływ poziomu stężenia na wartość BMD Brak zastosowania klinicznego, badany w aspekcie doświadczalnym	Surowica	Wheater et al., 2013 Bowsher et al., 2008
<b>Osteoprotegeryna (osteoprotegerin)</b>	OPG	<b>Rola</b> – alternatywny receptor dla RANKL, hamuje resorpcję kości uniemożliwiając kontakt RANKL z RANK na powierzchni osteoklastów i ich aktywację	Kluczowa rola w regulacji metabolizmu tkanki kostnej Dostarcza informacji na temat mechanizmu działania leków przeciw osteoporozie	Niejednoznaczny związek stężenia OPG z wartością BMD Brak zastosowania klinicznego, badany w aspekcie doświadczalnym	Surowica	Wheater et al., 2013 Kaczmarski i wsp., 2000



Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

Markery resorpcji kości	Symbol	Synteza / Lokalizacja / Rola w metabolizmie tkanki kostnej	Zalety	Wady	Próby	Literatura
<b>Hydroksypolina (hydroxyproline)</b>	HYP	<b>Lokalizacja</b> – aminokwas regularnie występujący w łańcuchu kolagenu typu I, charakterystyczny dla wszystkich typów kolagenu, wszystkich rodzajów tkanki łącznej		Pomiar zafałszowany przez hydroksypolinę pochodzącą z innych tkanek lub pożywienia (mięso, ryby, żelatyna) Duża zmienność wewnątrz- i międzyosobnicza Stężenie hydroksypoliny nie ulega wyraźnym zmianom podczas stosowania terapii antyresorpcyjnej Obecnie nie ma wartości diagnostycznej	Mocz	Seibel et al., 2005 Pagani et al., 2005
<b>Pirydynolina i deoksypirydynolina (pyridinoline and deoxypyridinoline)</b>	PYD i DPD	<b>Lokalizacja</b> – aminokwasy tworzące wiązania sieciujące w dojrzałych cząsteczkach kolagenu, głównie typu I, II i III różnych tkanek <b>Rola</b> – mechaniczna stabilizacja i wzmocnienie struktury dojrzałych włókien kolagenowych w macierzy zewnątrzkomórkowej	Markery o stosunkowo wysokiej świadomości Stężenie w moczu obrazuje wyłącznie resorpcję kości i degradację tylko dojrzałych form kolagenu Dobre narzędzie monitorowania skuteczności leków antyresorpcyjnych Potencjalny predyktor złamań kostnych Brak wpływu spożycia pokarmu na wynik - brak konieczności pobierania próby na czczo	Wpływ statusu hormonalnego na poziom PYD i DPD we krwi Zmienność dobową na poziomie 37% - najwyższy poziom wcześniej rano, najniższy popołudniu Trudności w wykonywaniu pomiaru Uciążliwość związana z koniecznością całonocowej zbiórki moczu oraz potrzebą korygowania wyniku w stosunku do kreatyniny PYD wykazuje wrażliwość na światło - degraduje pod wpływem intensywnego promieniowania ultrafioletowego	Mocz, surowica	Wheater et al., 2013 Kaczmarkiewicz i wsp., 2000 Unnanuntana et al., 2010 Bergmann et al., 2009
<b>N-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha alfa kolagenu typu I (amino-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen)</b>	NTX	<b>Lokalizacja</b> – usieciowany oktapeptyd N-końcowej cząsteczki kolagenu typu I usuwany przez katepsynę-K i uwalniany podczas resorpcji kości;	Mocz preferowanym źródłem NTX - próbki wysoce stabilne, zminimalizowanie wpływu dużej zmienności dobowej i spożycia pokarmu Podwyższone stężenie NTX u kobiet po menopauzie, spada wraz ze stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej NTX - predyktor ryzyka wystąpienia złamań u kobiet po menopauzie	W przypadku moczu – uciążliwa i kłopotliwa dla pacjenta 24godzinna zbiórka W przypadku surowicy – zmienność dobową i wpływ pokarmu powoduje konieczność poboru próbki krwi o określonej porze dnia, najlepiej rano i na czczo Wpływ czynności nerek oraz wątroby na stężenie NTX	Osocze, surowica, mocz	Wheater et al., 2013 Schlemmer et al., 1999
<b>C-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha alfa kolagenu typu I (carboxy-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen)</b>	CTX	<b>Lokalizacja</b> – usieciowany oktapeptyd C-końcowej części cząsteczki kolagenu typu I, uwalniany podczas resorpcji kości	Wysoce swoisty marker resorpcji kości Wzrost stężenia CTX po menopauzie i znaczne jego obniżenie po rocznym stosowaniu terapii antyresorpcyjnej - dobre narzędzie monitorowania leczenia Poziom CTX wykazuje pozytywną korelację z ubytkiem masy kostnej u pacjentów z osteoporozą Predyktor ryzyka wystąpienia złamań biodra u starszych kobiet Przyjmuje się, że zdecydowana większość pochodzi z resorpcji kości Dostępna zautomatyzowana immunochemiczna metoda oznaczania	Duża zmienność dobową na poziomie 57% (wyższa niż w przypadku NTX) – najwyższe stężenie w nocy, najniższe wcześniej rano i po południu Nie jest swoisty wyłącznie dla tkanki kostnej	Mocz, surowica	[33; 36; 37; 39; 40; 41; 43]

Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

<b>Karboksyterminalny usieciowany telopeptyd kolagenu typu I (carboxy-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen)</b>	ICTP CTX- MMP	<b>Lokalizacja</b> – fragment cząsteczki nowo zsyntetyzowanego kolagenu typu I kości		Duża zmienność dobową Pod wpływem czynności nerek i wątroby Zmieniony poziom ICTP przy nowotworowych przerzutach do kości Stężenie nie wzrasta u kobiet po menopauzie Nie odpowiada na standardowe leczenie osteoporozy - nie może być skutecznym narzędziem oceny stosowanej terapii antyresorpcyjnej	Mocz, surowica	Wheater et al., 2013 Seibel et al., 2005
<b>Helikoidalny peptyd kolagenu typu I alfa 1 (type I collagen alpha 1 helicoideal peptide)</b>	HELP	<b>Lokalizacja</b> –14-aminokwasowa sekwencja łańcucha alfa kolagenu typu I usunięta z kolagenu typu I przez katepsynę K podczas resorpcji kości	Wysoki stopień korelacji z innymi markerami degradacji kolagenu	Wymaga całodobowej zbiórki moczu ze szczególnym uwzględnieniem drugiej próbki moczu z korektą wobec kreatyniny - konieczność dodatkowych procedur walidacji	Mocz	Wheater et al., 2013 44].
<b>Izoforma 5b kwaśnej fosfatazy odpornej na winian (tertrate resistant acid phosphatase isoform 5b)</b>	TRAP5b	<b>Synteza</b> – osteoklasty <b>Lokalizacja</b> – enzym lizosomalny w ząbkowanej granicy osteoklastów i przestrzeni resorpcyjnej. <b>Rola</b> – fragmentacja kolagenu typu I	Bezpośrednio obrazuje aktywność osteoklastów Prognozuje wysoki poziom obrotu kostnego w połączeniu z utratą gęstości mineralnej kości	Zmienność dobową Brak stabilności w surowicy w temperaturze pokojowej Proteoliza we krwi Może pochodzić z alternatywnego źródła - aktywnych makrofagów	Surowica	Wheater et al., 2013 Seibel et al., 2005
<b>Katepsyna K (cathepsin K)</b>		<b>Synteza</b> – osteoklasty <b>Lokalizacja</b> – główny enzym proteolityczny ząbkowanej granicy aktywnie resorbującego osteoklastu <b>Rola</b> – fragmentacja telopeptów i helikalnych części kolagenu typu I	Odzwierciedlenie aktywności osteoklastów	Niestabilność w temperaturze pokojowej	Surowica, osocze,	Wheater et al., 2013 ; 44].
<b>Sklerostyna (sclerostin)</b>	SCL	<b>Synteza</b> – osteocyty <b>Rola</b> – blokada szlaku sygnalizacyjnego Wnt i jego wpływu na osteoblasty (zmniejszenie osteogenezy) poprzez przyłączenie do LRP5 lub LRP6	Wyższy poziom SCL zasocjowany z wyższym ryzykiem złamań biodra u starszych kobiet z niskim BMD; Spadek stężenia we krwi odzwierciedla skuteczność terapii antyresorpcyjnej z użyciem PTH;	Wpływ wielu czynników, m.in. cukrzycy, na stężenie; Zastosowaniem wyłącznie doświadczalne, brak zastosowania klinicznego;	Surowica	Wheater et al., 2013 46; 47].
<b>Białko DKK1 (Dickkopf-related protein 1)</b>	DKK1	<b>Synteza</b> – osteocyty <b>Rola</b> – blokada szlaku sygnalizacyjnego Wnt i jego wpływu na osteoblasty (zmniejszenie osteogenezy) poprzez przyłączenie do LRP5 lub LRP6	Kluczowa rola w regulacji metabolizmu tkanki kostnej	Wpływ wielu czynników, m.in. cukrzycy, na stężenie; Zastosowaniem wyłącznie doświadczalne, brak zastosowania klinicznego;	Surowica	Wheater et al., 2013

Również w przypadku oznaczeń w surowicy należy uwzględnić rytm dobowy oraz wpływ składników pokarmowych na stężenie markerów. Powoduje to pewne ograniczenia, dotyczące pobrania próbki krwi o określonej porze dnia, najlepiej rano na czczo [2, 29].

Na szczególną uwagę zasługuje CTX, który został wybrany markerem referencyjnym dla oceny resorpcji kości przez grupę roboczą Międzynarodowej Fundacji Osteoporozy. Pomimo, że nie jest on swoisty wyłącznie dla tkanki kostnej przyjmuje się, że zdecydowana jego większość pochodzi z resorpcji kości. Stężenie CTX wzrasta po menopauzie, stąd przy pomocy tego markera można prognozować ryzyko wystąpienia złamań szyjki kości udowej u starszych kobiet [30]. Udokumentowano, że CTX jest predyktorem złamań i pozytywnie reaguje na terapię antyresorpcyjną, co sprawia, że jest dobrym narzędziem monitorowania leczenia [24, 25]. Po rocznym stosowaniu terapii antyresorpcyj-

nej CTX oddaje obraz skuteczności leczenia, obniżając znacznie swoje stężenie. Dla oznaczenia CTX dostępna jest zautomatyzowana metoda immunochemiczna, dokładnie opracowano sposób pobierania materiału biologicznego, znana jest także zmienność biologiczna i analityczna tego markera [16, 23, 31].

N-terminalny usieciowany telopeptyd kolagenu typu I (NTX) obecny jest zarówno w surowicy, jak i w moczu. Na stężenie NTX wpływa czynność nerek oraz wątroby i w bardzo nieznaczny sposób żywienia. Charakteryzuje się zmiennością dobową, lecz mniejszą w porównaniu z CTX. U kobiet po menopauzie obserwuje się podwyższone stężenie tego markera. Ponieważ NTX pochodzący z moczu wykazuje wysoką stabilność, jak również z uwagi na nieinwazyjność sposobu pobierania, preferowane jest pobieranie próbki moczu na czczo. Również NTX na podstawie badań został zakwalifikowany jako predyktor ryzyka wystąpienia złamań u kobiet po menopauzie [14, 16].

Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

Innym markerem resorpcji pochodzącym z degradacji cząsteczki kolagenu podczas resorpcji kości jest helikoidalny peptyd kolagenu typu I alfa 1 (HELP - *type I collagen alpha 1 helicoideal peptide*). Ma on postać 14-aminokwasowej sekwencji łańcucha alfa kolagenu typu I (aminokwasy: 620-633). Zostaje wycięty z heliakalnego regionu kolagenu typu I przez katepsynę K. Wykazuje wysoki stopień korelacji z innymi markerami degradacji kolagenu. Jest markerem występującym w moczu i wymaga całodobowej zbiórki ze szczególnym uwzględnieniem drugiej próbki moczu z korektą wobec kreatyniny oraz dodatkowych procedur walidacji [16, 30].

Osteoklasty resorbując tkankę kostną wydzielają enzymy lizujące składniki macierzy kostnej. Enzymy te nazywane są często markerami aktywności osteoklastów. Należy tutaj izoforma 5b kwaśnej fosfatazy odpornej na winian (TRAP5b - *tertrate resistant acid phosphatase isoform 5b*) oraz katepsyna K - główny enzym proteolityczny osteoklastów. Obydwa enzymy odpowiedzialne są za degradację kolagenu typu I poprzez fragmentację telopeptydów a katepsyna K dodatkowo powoduje degradację heliakalnych części kolagenu typu I. Markery te bezpośrednio obrazują aktywność osteoklastyczną, jednakże charakteryzują się niestabilnością w surowicy w temperaturze pokojowej. Stąd nie mają one zastosowania w praktyce klinicznej, z uwagi na utrudnienia jakie sprawiają podczas oznaczeń [14, 30].

Osobną grupę stanowią markery pochodzące z osteocytów, które jako dojrzałe komórki tkanki kostnej reagują na zmiany zachodzące w mikrostrukturze kości syntezą odpowiednich białek. Osteocyty wydzielają m.in. sklerostynę (SCL) oraz białko DKK1. Zarówno sklerostyna jak i białko DKK1 przyłączając się do receptorów LRP5 lub LRP6 blokują szlak sygnalizacyjny Wnt i jego wpływ na osteoblasty, a co za tym idzie hamują osteogenezę. Do zalet sklerostyny należą zmiany stężenia we krwi odzwierciedlające skuteczność terapii antyresorpcyjnej z użyciem parathormonu. Niektóre choroby, jak cukrzyca, wpływają na poziom stężenia sklerostyny i białka DKK1 w surowicy, dlatego dotychczas markery te nie znalazły większego zastosowania klinicznego. Z badań jednoznacznie wynika, iż wyższy poziom sklerostyny jest zasocjowany z wzrostem ryzyka złamań szyjki kości udowej u starszych kobiet z niską wartością BMD [30, 31].

## Podsumowanie

Wprowadzenie markerów obrotu kostnego do rutynowej diagnostyki nadal budzi ogromne nadzieje na znalezienie niezawodnych wskaźników resorpcji i syntezy kości. Rezultaty badań dotyczących ich roli w wyznaczaniu tempa obrotu kostnego nie są jednoznaczne i wykazują niekiedy różnice pomiędzy populacjami. Wynika to głównie z szerokiego spektrum oznaczanych markerów, stosowanego leczenia i problemów metodologicznych w dobraniu odpowiedniej metody oznaczania. Ponadto markery obrotu kostnego oznaczane z surowicy lub z moczu obrazują zmiany zachodzące w metabolizmie całego szkieletu, niezależnie od ich przyczyny, nie są zatem swoiste tylko dla osteoporozy.

Ponadto na stężenie markerów obrotu kostnego istotnie wpływają różne czynniki, zarówno na poziomie biologicznym jak i analitycznym, co sprawia, że użyteczność testów diagnostycznych jest wciąż bardzo ograniczona.

Do czynników biologicznych należą: zmienność dobową, sezonową, czy zmienność związana z cyklem miesięczkowym, ciąża, karmienie piersią, status hormonalny, co powoduje proble-

my ze standaryzacją materiału biologicznego. Inne wymieniane czynniki biologiczne to przebyte w ciągu ostatniego roku złamania, wiek, płeć, aktywność fizyczna, unieruchomienie, niektóre choroby (cukrzyca, niewydolność nerek, choroby tarczycy), przyjmowane leki, a także dieta [32, 33].

Wśród czynników analitycznych wpływających na wynik pomiaru markerów kostnych wymienić należy: sposób pobierania próbki, jej zabezpieczenie oraz transport, a następnie warunki przechowywania i co najważniejsze zastosowane do oznaczeń techniki. Zaleca się zatem, by pacjent poddawał się regularnie badaniom w tym samym laboratorium, oznaczającym te same markery przy wykorzystaniu jednego, określonego testu [34]. W przypadku oznaczania markerów z próbki moczu pomiary należy wykonywać w pierwszej lub drugiej porannej jego porcji bądź w próbce pochodzącej z 24-godzinnej zbiórki. Dodatkowo przeprowadzić należy korektę pomiaru markera wobec stężenia kreatyniny. W przypadku próbki surowicy osobnicza zmienność dobową markera jest znacznie niższa, polecane jest natomiast pobieranie próbki rano na czczo, zawsze o tej samej porze [35, 36]. Same testy sprawiają istotne trudności przy standaryzacji metod ich rutynowego przeprowadzania. Pomimo tego, z uwagi na nieinwazyjność stosowanych metod, czułość, dokładność oraz szybkość i łatwość przeprowadzenia testów coraz częściej proponuje się wdrożenie oznaczania biochemicznych markerów obrotu kostnego do rutynowej diagnostyki [37].

Obecnie markery obrotu kostnego znalazły również zastosowanie w poznaniu mechanizmów działania nowych leków a także w monitorowaniu ich skuteczności w terapii osteoporozy. Mechanizm działania, dawka i sposób podawania leku może powodować zmianę stężenia markera w stosunku do stanu przed rozpoczęciem terapii. Skuteczne leki antyresorpcyjne powinny powodować wyraźne obniżenie stężenia markerów resorpcji po upływie 4-6 tygodni a w przypadku markerów syntezy po 2-3 miesiącach, co obserwowane jest przez okres przyjmowania leków. Brak obniżenia poziomu markerów kostnych może oznaczać nieodpowiednio dobraną terapię i wskazywać na konieczność wdrożenia innych leków [34, 37, 38]. W przyszłości pozwoli to prawdopodobnie na zastosowanie terapii indywidualnej u każdego pacjenta, zindywidualizowanie dawki i częstości podawania leków. Monitorowanie interakcji pomiędzy markerem a stężeniem stosowanego leku może spowodować poprawę skuteczności terapii oraz istotne obniżenie częstości złamań u pacjentów z osteoporozą [23, 38].

## Oświadczenie autorów:

1. Natalia Drwęska-Matelska – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Hubert Wolski – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, przygotowanie manuskryptu.
3. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz – autor koncepcji i założeń pracy, współautor tekstu pracy, korekta i aktualizacja literatury, analiza i interpretacja wyników, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.
4. Marian Majchrzycki – analiza i interpretacja wyników, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Radosław Kujawski – współautor tekstu pracy, korekta i aktualizacja literatury.
6. Bogusław Czerny – analiza i interpretacja wyników, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Natalia Drwęska-Matelska et al. *Nowoczesna diagnostyka osteoporozy w oparciu o wykorzystanie biochemicznych markerów obrotu kostnego.*

### Źródło finansowania:

Badania statutowe Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

### Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

### Piśmiennictwo

- World Health Organization. Report of a WHO Scientific Group. *Prevention And Management Of Osteoporosis*. Geneva 2003.
- Poor G, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ3rd. Determinants of reduced survival following hip fractures in men. *Clin Orthop Relat Res*. 1995, 319, 260-265.
- Melton LJ3rd. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J Bone Miner Res*. 2003, 18, 1139-1141.
- Kanis JA, Johnell O. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*. 2006, 17, 1726-1733.
- Kanis JA. On behalf of the WHO Scientific Group. Assessment of osteoporosis at the primary health-care level Technical report. *University of Sheffield UK*. 2007.
- Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, [et al.]. Osteoporosis in the European Union: Medical Management, Epidemiology and Economic Burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013, 8, 136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.
- Raport of National Osteoporosis Society: <http://www.nos.org.uk/page.aspx?pid=328>.
- Jaworski M, Lorenc RS. Risk of hip fracture in Poland. *Med Sci Monit*. 2007, 13, 206-210.
- National Osteoporosis Foundation 2011: [www.nof.org](http://www.nof.org).
- Raport National Osteoporosis Society: <http://www.nos.org.uk/Document.Doc?id=47>.
- Kanis JA. Diagnosis Of Osteoporosis And Assessment Of Fracture Risk. *Lancet*. 2002, 359, 1929-1936.
- Lee J, Vasikaran S. Current Recommendations for Laboratory Testing and Use of Bone Turnover Markers in Management of Osteoporosis. *Ann Lab Med*. 2012, 32, 105-112.
- Kanis JA, Johnell O, Oden A, [et al.]. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int*. 2008, 19, 385-397.
- Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, [et al.]. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int*. 2011, 22, 391-420.
- Wheater G, Elshahaly M, Tuck SP, [et al.]. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med*. 2013, 11, 201. doi: 10.1186/1479-5876-11-201.
- Jurkowski P, Mierzwińska-Nastalska E, Kostrzewa-Janicka J. Zastosowanie biochemicznych markerów obrotu kostnego w medycynie ogólnej i stomatologii. *Dent Med Probl*. 2010, 47, 199-205.
- Baczyk G, Chuchracki M, Klejowski A. The relationship between selected biochemical parameters, clinical factors and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Ginekol Pol*. 2012, 83, 194-201.
- Delmas PD, Vrijens B, Roux C, [et al.]. A reinforcement message based on bone turnover marker response influences long-term persistence with risedronate in osteoporosis: The IMPACT study. *J Bone Miner Res*. 2003, 18, 374-378.
- Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005, 26, 97-122.
- Eyre DR. The specificity of collagen cross-links as markers of bone and connective tissue degradation. *Acta Orthop Scand*. 1995, 266, 166-170.
- Cloos PA, Christgau S. Characterization of aged osteocalcin fragments derived from bone resorption. *Clin Lab*. 2004, 50, 585-598.
- Kaczmarewicz E. Wartość diagnostyczna markerów obrotu kostnego - uzgodnienia. W: Diagnostyka osteoporozy. Red. Lorenc R. Warszawa: *Osteoforum*. 2000, 233-248.
- Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest*. 2005, 28, 8-13.
- Odrowąż-Sypniewska G, Nowacki W. Zastosowania kliniczne oznaczania biomarkerów przebudowy kości. Nowe zalecenia Grupy Roboczej Międzynarodowej Fundacji Osteoporozy - Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej ds. Standaryzacji w zakresie Markerów Przebudowy Kości. *Diagn Lab*. 2011, 47, 219-222.
- Bowsher RR, Sailstad JM. Insights in the application of research-grade diagnostic kits for biomarker assessments in support of clinical drug development: Bioanalysis of circulating concentrations of soluble receptor activator of nuclear factor B ligand. *J Pharm Biomed Anal*. 2008, 48, 1282-1289.
- Bollen AM, Kiyak HA, Eyre DR. Longitudinal evaluation of a bone resorption marker in elderly subjects. *Osteoporos Int*. 1997, 6, 544-549.
- Schlemmer A, Hassager C. Acute fasting diminishes the circadian rhythm of biochemical markers of bone resorption. *Eur J Endocrinol*. 1999, 140, 332-337.
- Kamel S, Brazier M, Néri V, [et al.]. Multiple molecular forms of pyridinoline cross-links excreted in human urine evaluated by chromatographic and immunoassay methods. *J Bone Miner Res*. 1995, 10, 1385-1392.
- Chesnut CH, Bell NH, Clark GS, [et al.]. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am J Med*. 1997, 102, 29-37.
- Garnero P. Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2009, 7, 84-90.
- Bergmann P, Body JJ, Boonen S, [et al.]. (Members of Advisory Board on Bone Markers). Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Int J Clin Pract*. 2009, 63, 19-26.
- Drake MT, Srinivasan B, Mödder UI, [et al.]. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010, 95, 5056-5062.
- Gennari L, Merlotti D, Valenti R, [et al.]. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012, 97, 1737-1744.
- Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane J. The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am*. 2010, 92, 743-753.
- Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int*. 2000, 11, 30-44.
- Seibel MJ. Clinical Application of Biochemical Markers of Bone Turnover. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006, 50, 603-620.
- Prestwood KM, Pilbeam CC, Burleson JA, [et al.]. The short-term effects of conjugated estrogen on bone turnover in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994, 79, 366-371.
- Terreni A, Pezzati P. Biochemical markers in the follow-up of the osteoporotic patients. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2012, 9, 80-84.