
PREHLADNÝ REFERÁT

LABORATÓRNE VYŠETROVACIE METÓDY KOSTNÉHO METABOLIZMU

M. STANČÍKOVÁ, R. IŠTOK, P. MASARYK, A. LETKOVSKÁ, J. ROVENSKÝ

LABORATORY METHODS OF BONE TURNOVER EXAMINATION

Výskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany
Riaditeľ: prof. MUDr. J. Rovenský, DrSc.

Súhrn

V poslednom čase sa prudko rozvíjajú neinvazívne techniky merania kostnej hmoty spolu s vývojom senzitívnych a špecifických biochemických markerov kostnej formácie a resorpcie. Najcitlivejšie a zároveň najčastejšie používané markery osteoformácie v súčasnosti sú osteokalcín a kostný izoenzym alkalické fosfatázy. Pre osteoresorpciu sa používajú pyridinolinové priečnoväzbové zlúčeniny alebo telopeptidové fragmenty kolagénu. Keďže jednotlivé markery zachytávajú rôzne fázy kostnej remodelačnej aktivity, paralelné určovanie viacerých markerov, najmä kombinácia markerov osteoformácie a osteoresorpcie najlepšie odráža charakter kostnej remodelácie. Optimálna kombinácia markerov, ktorá sa môže líšiť podľa druhu choroby a terapie, nebola zatiaľ určená.

Určovanie biochemických markerov sa osvedčilo pri diagnostike rôznych kostných chorôb, najmä však pri prognóze postmenopauzálnnej osteoporózy a následných fraktúr. U postmenopauzálnnych žien vzrast rýchlosti kostného metabolizmu je priamo úmerný strate kostnej hmoty. Liečba anti-resorpčnými liekmi, ako sú estrogény, bifosfonáty a kalcitonín, výrazne znižuje markery kostného metabolizmu a tento pokles koreluje s dlhodobým efektom tejto liečby na kostnú hmotu. Diagnostická a prognostická hodnota biochemických markerov je však relatívna, a preto by sa mali vždy hodnotiť spolu s výsledkami klinických vyšetrení, ďalších laboratórnych testov, röntgenového, príp. densitometrického vyšetrenia alebo výsledkami vyšetrovania kostnej biopsie.

Autori podávajú podrobný prehľad jednotlivých biochemických markerov, ich charakteristiku, spôsob stanovenia a klinický význam.

Kľúčové slová: kostný metabolizmus, biochemické markery, osteoporóza.

Summary

Remarkable advances have recently been witnessed in the development of non-invasive techniques of bone mass measurements and of sensitive and specific markers of bone formation and resorption. The most sensitive and currently also the most frequently used markers of osteoformation are osteocalcin and the bone isoenzyme of alkaline phosphatase. Pyridinoline cross-linked compounds and telopeptide fragments of collagen have been used for the evaluation of osteoresorption. Since individual markers reflect different phases in the remodeling activity of bones, the parallel determination of several markers, particularly the combination of markers of osteoformation and osteoresorption, yields the most representative picture of bone remodeling. The optimal combinations of markers, adjusted to the type of disease and therapy, have not yet been defined.

The analysis of biochemical markers has proved useful in the diagnosis of different osteopathies and especially in the prognosis of postmenopausal osteoporosis and subsequent fractures. In postmenopausal women, the increased rate of bone metabolism is in direct relation to the loss in bone mass. Treatment with antiresorptive drugs, such as estrogens, bisphosphonates and calcitonin, results in a marked decrease in bone metabolism markers, which corresponds to the long-term effect of this therapy on bone mass. Biochemical markers, however, have a relative value and should thus always be assessed along with the results of clinical examinations, other laboratory tests, radiographic and densitometric examinations and bone biopsy.

The paper presents a detailed overview of individual biochemical markers, their characteristics, mode of determination and clinical implications.

Key words: bone metabolism, biochemical markers, osteoporosis.

V priebehu života sa kosť podobne ako iné tkanivá neustále obmieňa v dynamickom procese kontinuálnej degradácie (resorpcie) a obnovy (formácie). Špecializované bunky — osteoblasty kosť obnovujú, osteoklasty naopak degradujú. Osteoresorpcia a osteoformácia úzko na seba nadväzujú v presnej časovej následnosti v mieste kostnej remodelácie v tzv. kostnej remodelačnej jednotke. Rozsah novotvorby kostného tkaniva závisí od počtu týchto jednotiek, ktoré sa v určitej časovej perióde na určitom úseku skeletu aktivujú, a od rovnováhy medzi formáciou a resorpciou v rámci týchto jednotiek. Pre osteoporózu je charakteristické narušenie rovnováhy medzi resorpciou a formáciou v remodelačných jednotkách, ako aj zvýšená aktivačná frekvencia, ktorá zodpovedá za výrazné zvýšenie kostného obratu po menopauze.

Osteoporóza môže byť dlho bez príznakov a ochorenie sa obvyčajne diagnostikuje až po vzniku zlomeniny (najmä pri senilnej osteoporóze). Toto štádium je však už obvyčajne spojené s hlbokým narušením kostnej štruktúry, perforovanými trámami a nenávratne strateným podkladom pre činnosť osteoblastov. Preto je pochopiteľná snaha nájsť také ukazovatele, ktoré by vývoj osteoporózy vopred signalizovali, a tým umožnili zavedenie včasnej a účinnej terapie. Popri invazívnych metódach, ako je histomorfometria lopaty bedrovej kosti, celotelová retencia značených bifosfonátov, sa dnes rozvíjajú predovšetkým neinvazívne metódy, ktoré sú ľahšie uskutočniteľné, možno ich použiť podľa potreby častejšie a umožňujú dlhodobé monitorovanie pacienta. Od neinvazívnych metód sa očakáva nielen hodnotenie straty kostnej hmoty, ktorú možno určiť jednorazovým denzitometrickým meraním, ale aj určenie rýchlosti jej úbytku. Preto sa dnes používajú okrem bežných laboratórnych meraní (napr. určovanie kalcúrie, vápnika a fosforu v sére) špecifické markery charakteristické pre osteoformáciu a osteoresorpciu, ktoré sa podľa potreby môžu doplniť hormonálnymi vyšetreniami (kalciotropných, hypofýzových a ovariálnych hormónov). Keďže jednotlivé markery zachytávajú rôzne fázy kostnej remodelačnej aktivity, paralelné určo-

Bone, similar to other tissues, undergoes constant renewal as a dynamic process of continual degradation (resorption) and restoration (formation) throughout the course of life. Specialized cells called osteoblasts are involved in bone production, while osteoclasts are associated with its degradation. Osteoresorption and osteoformation are tightly coupled to an exact time sequence at the site of bone remodeling, in the so-called remodeling unit. The extent of bone tissue remodeling depends on the number of these units, which are activated in a defined area of the skeleton within a given period of time, and on the balance between formation and resorption within these units. Osteoporosis is characterized by both an imbalance between resorption and formation within bone remodeling units and by an increased activation frequency, the latter being responsible for the markedly enhanced rate of bone turnover after menopause.

Osteoporosis may remain asymptomatic over a long period of time and often fails to be diagnosed unless the patient suffers a fracture (especially in senile osteoporosis). This stage, however, is mostly associated with an already severe derangement of bone structure, perforated trabeculae, and an irreversibly lost basis for the activity of osteoblasts. The search for indicators signalling the development of osteoporosis is thus conceivable as they would provide the necessary information for introducing early and effective therapy. Besides invasive methods, such as histomorphometry of the iliac crest, whole-body retention of labeled bisphosphonates, predominantly non-invasive methods are currently being developed. These are easier to perform, can be applied more frequently if required, and allow long-term monitoring of the patient. Non-invasive methods are not only expected to assess the loss of bone, which can be established by a single densitometric measurement, but also to the rate of loss. In addition to common laboratory measurements (e.g. calciuria, serum calcium and phosphorus), specific markers are being used for this purpose, which are

Tab. 1. Biochemické markery kostného metabolizmu.

Osteoformácia	Osteoresorpcia
Celková a špecifická alkalická fosfatáza	Kyslá fosfatáza rezistentná proti tartarátu
Osteokalcín (BGP)	Telopeptidy kolagénu
Prokolagén I peptidy	v sére (ICTP)
Iné nekolagénové bielkoviny (osteonektín, sialoproteín II)	<i>V moči</i> Hydroxyprolín Hydroxylyzínové glykozidy Pyridinolín, deoxypyridinolín a iné priečnoväzbové peptidové fragmenty kolagénu

Tab. 1. Biochemical markers of bone metabolism.

Osteoformation	Osteoresorption
Total and bone specific alkaline phosphatase	Tartarate resistant acid phosphatase
Osteocalcin (BGP)	Collagen telopeptides
Procollagen I peptide	in serum (ICTP)
Other noncollagenous proteins (osteonectin, sialoprotein II)	<i>In urine</i> Hydroxyproline Hydroxylysine glycosides Pyridinoline, deoxypyridinoline and other cross-linked peptide fragments of collagen

vanie viacerých markerov, najmä kombinácia markerov osteoformácie a osteoresorpcie najlepšie ozrejmi charakter kostnej remodelácie. Zásadne však platí, že biochemické markery kostného metabolizmu nie sú špecifické pre určitú kostnú chorobu, ale informujú o celkovom metabolickom stave skeletu, o vzájomnom prepojení osteoresorpcie a osteoformácie na všetkých miestach a vo všetkých štádiách kostnej remodelácie. Pretože kostný metabolizmus sa s vekom výrazne mení, pri každom meraní treba namerané hodnoty porovnať s hodnotami väčšieho súboru jedincov danej vekovej kategórie a rovnakého pohlavia (skóre Z a T).

Ako biochemické markery kostného metabolizmu sa používajú enzýmy osteoblastov a osteoklastov, napr. alkalická a kyslá fosfatáza, a komponenty kostného matrixu, ktoré sa do cirkulácie uvoľňujú počas kostnej formácie a resorpcie. Biochemické markery, ktoré sa dnes používajú na sledovanie osteoformácie a osteoresorpcie, sú v tabuľke 1.

BIOCHEMICKÉ MARKERY KOSTNEJ FORMÁCIE

Sérová alkalická fosfatáza

Sérová alkalická fosfatáza je veľmi často používaným ukazovateľom kostnej formácie. Pri osteoporóze sa jej celková aktivita zvyšuje len málokedy a ani v týchto prípadoch nemožno vylúčiť, že zvýšená enzymová aktivita odráža zvýšenú aktivitu pečeneového izoenzýmu. Ľudské sérum obsahuje rôzne izoenzýmy alkalického fosfatázy: kostný, pečeneový, intestinálny a počas gravidity aj placentárny. Intestinálnu a placentárnu formu možno oddeliť relatívne ľahko, väčší problém spôsobuje odlišenie kostného a pečeneového izoenzýmu. Tieto dva izoenzýmy sú produktmi jedného génu a líšia sa len posttranslačnou modifikáciou. Na selektívne stanovenie kostnej formy boli vypracované rôzne laboratórne metódy, ktoré využívajú rozdielnu citlivosť týchto enzýmov na inaktiváciu teplotou, rôzne inhibítory a aktivátory alebo delenie na základe odlišnej hmotnosti a náboja pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom géli (22). Odlišnosť sacharidovej zložky v molekule pečeneového a kostného izoenzýmu využívajú lektínové metódy. Jednotlivé izoenzýmy sa oddeľujú pomocou špecifických lektínov, ako je WGA (wheat germ agglutinin) a konkanavalín. Ani jedna z týchto metód však nemá dostatočnú citlivosť, špecifickosť, spoľahlivosť a zároveň jednoduchosť potrebnú na rutinnú aplikáciu. Aj nové metódy s monoklonovými protilátkami viažu popri kostnom izoenzýme aj malé množstvo pečeneového izoenzýmu (5–15 %) a vyššia špecifickosť týchto metód je často na úkor menšej citlivosti a naopak. Aktivita kostného izoenzýmu môže byť zvýšená nad hornú hranicu normy pri hypertyreóze, primárnej hyperparatyreóze a pri chronickej obličkovej nedostatočnosti (6). Pri Pagetovej chorobe koreluje s aktivitou choroby. Je citlivým markerom zvýšeného kostného metabolizmu u postmenopauzálnych žien a vhodným indexom na posúdenie účinnosti antiresorpčnej liečby.

characteristic for osteoformation and osteoresorption. When necessary, these can be supplemented by hormonal examinations (calcitotropic, pituitary, ovarian, and other hormones). Since individual markers reflect different phases of the remodeling activity of bone, a parallel determination of several markers, particularly the combination of the markers of osteoformation and osteoresorption, can provide the best insight into the nature of bone remodeling. Principally, however, biochemical markers of bone metabolism are not specific for a given bone disorder.

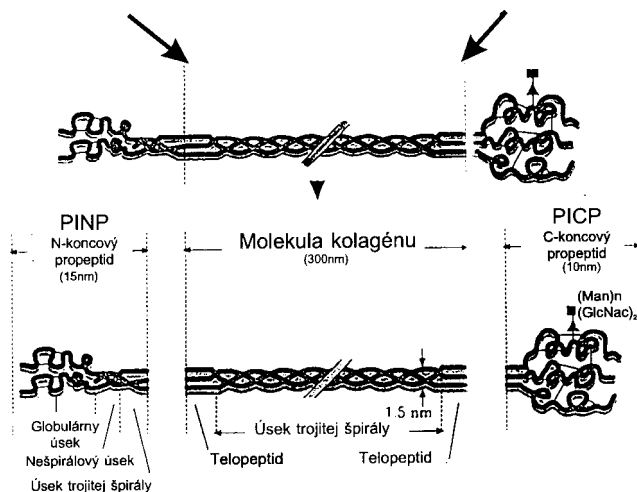
In fact, they give information on the overall metabolic state of the skeleton, on the relation of osteoresorption and osteoformation at all sites and stages of bone remodeling. With respect to the marked changes of bone metabolism undergone through ageing, the values obtained at each measurement need to be compared with values from a large age and sex matched series of subjects (Z and T scores).

Biochemical markers of bone metabolism are enzymes of osteoblasts and osteoclasts, e.g. alkaline and acid phosphatase, and components of the bone matrix released into the circulation in the course of bone formation and reorption. The biochemical markers currently used in investigating osteoformation and osteoresorption are given in Table 1.

BIOCHEMICAL MARKERS OF OSTEOFORMATION

Serum alkaline phosphatase

Serum alkaline phosphatase is the most commonly used marker of osteoformation. Its overall activity is but rarely increased in osteoporosis, and even in cases of enhanced enzymatic activity the involvement of increased activity of the hepatic isoenzyme can not be excluded. Human serum contains several isoenzymes of alkaline phosphatase: bone, hepatic, intestinal, and in pregnancy also placental. The intestinal and placental forms can readily be distinguished, yet there are problems in differentiating bone from hepatic form. The latter two are encoded by a single gene and they differ only by post-translational modification. Several laboratory methods have been developed for selective determination of the bone form. They are based on the different sensitivity of these enzymes to heat inactivation using several inhibitors and activators, as well as electrophoretic separation on polyacrylamide gel based on differences in weight and charge (23). The difference in the saccharide component in the molecule of bone and hepatic isoenzyme is used in methods with lectin. Individual isoenzymes are separated by means of specific lectins, such as wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin. However, neither of these methods give adequate sensitivity, specificity or accuracy, nor is their utilization so easy as to be appropriate for routine use. New methods using monoclonal antibodies also bind a small amount of the liver isoenzymes (5–15 %) along with the bone isoenzyme and their higher specificity is con-



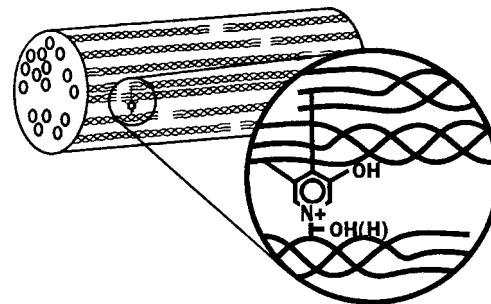
Obr. 1. Štruktúra prokolagénu a kolagénu s vyznačenými propeptidmi a telopectidmi. Modifikované podľa Prockopa a spol. (17).
Fig. 1. Structure of procollagen and collagen; propeptides and telopeptides indicated. Modified from Prockop et al. (17).

Aktivita kostného izoenzýmu po liečbe bifosfonátmi a estrogénmi po 1—2 mesiacoch klesá. Odporúča sa aj na sledovanie fluoridovej terapie, kde sa však naopak pri úspešnej terapii jej aktivita zvyšuje.

Sérový osteokalcín

Osteokalcín, nazývaný aj kostný Gla-proteín (BGP, bone Gla-protein), je malá nekolagénová bielkovina (mol. hmotnosť 5800 Da) špecifická pre kostnú a dentálnu hmotu. Tvorí 1—2 % kostných bielkovín a obsahuje 3 zvyšky kyseliny gamakarboxyglutámovej, ktoré sa syntetizujú v prítomnosti vitamínu K a umožňujú jeho väzbu s vápnikom. Prednostne sa syntetizuje v osteoblastoch pod kontrolou 1,25-dihydroxyvitamínu D3 a potom sa inkorporuje do extracelulárnej kostnej hmoty. Časť novosyntetizovaného osteokalcínu sa uvoľňuje do cirkulácie a odzrkadľuje intenzitu kostnej formácie.

Osteokalcín je v súčasnosti popri kostnom izoenzýme alkalického fosfatázy najviac používaným markerom kostnej formácie. Zvyšuje sa aj počet kitov na určovanie osteokalcínu, ktoré sa líšia najmä špecifickosťou a senzitivitou protilátky. Určovanie osteokalcínu komplikuje skutočnosť, že protilátka vycytáva aj fragmenty osteokalcínu, ktoré sa uvoľňujú do cirkulácie pri kostnej resorpcii. Osteokalcín sa navyše degraduje proteínázami séra. Garnero a spol. (7) opísali, že v sére sa nachádza približne jedna tretina intaktného osteokalcínu, tretina malých fragmentov a ďalšia tretina väčšieho fragmentu z N-konca molekuly. Veľký rozptyl hodnôt osteokalcínu opísaných v literatúre zrejme zapríčiňuje odlišnosť polyklonových a monoklonových protilátok, ktoré viažu rôzne fragmenty s odliš-



Obr. 2. Lokalizácia trojvalentnej pyridinolínovej priečnej väzby v kolagénových vláknach.

Fig. 2. Localization of trivalent pyridinol cross-link in collagen fibrils.

mitant with their lower sensitivity and vice versa. The activity of the bone isoenzyme can exceed the normal upper limit in hyperthyroidism, primary hyperparathyroidism and chronic renal insufficiency (6). In Paget's disease its activity correlates with the disease's activity. It is a sensitive marker of increased bone metabolism in postmenopausal women and an index for assessing the efficacy of antiresorptive therapy. The activity of the bone isoenzyme decrease after 1—2 months of therapy with bisphosphonates and estrogens. It is also recommended in the monitoring of fluoride therapy where, however, successful therapy is manifested by its increase.

Serum osteocalcin

Osteocalcin, also called bone Gla-protein (BGP) is a small non-collagenous protein (molecular weight 5800 Da), specific for bone and dental mass. It represents 1—2 % of bone proteins and contains 3 residues of gamma carboxyglutamic acid, which are synthesized in the presence of vitamin K and allow its binding with calcium. Osteocalcin is predominantly synthesized in osteoblasts under the control of 1.25-dihydroxyvitamin D3, to be then incorporated into extracellular bone matrix. A part of the newly synthesized osteocalcin is released into the circulation and is a marker of the intensity of osteoformation.

Along with the bone isoenzyme of alkaline phosphatase, osteocalcin is currently the most frequently used marker of bone formation. The increasing number of kits for osteocalcin determination differ particularly in the specificity and sensitivity of the antibody. Osteocalcin determination is complicated by the fact that the antibody also recognizes osteocalcin fragments released into the circulation at bone resorption. Moreover, osteocalcin is further degraded by serum proteinases. Garnero et al. (7) reported that one third of serum osteocalcin is intact, one third is represented by several small fragments and another third by a large N-terminal molecule fragment. The great variety of osteocalcin values reported in the literature is apparently caused by differences

nou citlivosťou. Z hľadiska validity, citlivosti a reprodukovateľnosti merania osteokalcínu sa ako najperspektívnejšia zdá metóda využívajúca dve monoklonové protilátky detegujúce intaktnú molekulu spolu s N-koncovým peptidom.

Pri určovaní osteokalcínu treba prihliadnuť aj na to, že táto bielkovina má určitý cirkadiánnny rytmus, pričom najvyššie hodnoty koncentrácie dosahuje o 4. hodine nadržom a o 17. hodine popoludní. Signifikantný účinok na kostný metabolizmus má aj menštruačný cyklus. Najvyššia koncentrácia osteokalcínu sa namerala v luteálnej fáze.

Sérový osteokalcín koreluje s rastom skeletu v období puberty, zvyšuje sa pri rôznych poruchách kostného metabolizmu spojených so zvýšeným kostným obratom, napr. pri primárnej a sekundárnej hypertyreóze, hyperparatyreóze a akromegálii (2). Znižuje sa pri hypotyreóze a hypoparatyreóze, u pacientov liečených glukokortikoidmi, pri osteoporóze vyvolanej chorobami pečene a cukrovkou, u niektorých pacientov s viacnásobným myelómom a malígnou hyperkalcémiou. Zaujímavé je, že pri Pagetovej chorobe sa koncentrácia osteokalcínu zvyšuje oveľa menej ako hodnota kostného izoenzymu alkalického fosfatázy.

Koncentrácia sérového osteokalcínu sa zvyšuje aj pri niektorých formách osteoporózy, ale toto zvýšenie je obvyčajne v rámci normálnych hodnôt. Patologicky zvýšené hodnoty sa namerali u postmenopauzálnych žien s rýchlou stratou kostnej hmoty. Z hľadiska prognózy zlomeniny krčka femuru u starších žien sa ako perspektívne ukazuje meranie dekarboxylovaného osteokalcínu (20).

Prokolagén I peptidy

Prekurzorom kolagénu pri biosyntéze je prokolagén, ktorý je približne o 50 % väčší ako sám kolagén. Prokolagén má prídavné peptidy na N-konci aj na C-konci, preto sa hovorí o amino- (PINP) a karboxyterminálnych propeptidoch (PICP) (obr. 1). Pred tvorbou kolagénových fibríl sa tieto terminálne peptidy uvoľňujú proteolytickým štiepením a dostávajú sa do cirkulácie. Ako marker osteoformácie sa sleduje karboxyterminálny propeptid kolagénu I, PICP (procollagen I carboxyterminal propeptide) v sére. Propeptid PICP je glykoproteín s molekulovou hmotnosťou približne 100 000. U postmenopauzálnych žien sa jeho hodnota síce zvyšuje, toto zvýšenie však zvyčajne neprekročí 20 % pôvodnej hodnoty. Estrogénovo-gestagénová terapia koncentráciu PICP znižuje (11). Podobne účinkujú glukokortikoidy. 48 hodín po aplikácii prednizónu (60 mg) koncentrácia PICP klesne na polovicu. Korelácia medzi PICP a histologickým obrazom kostnej formácie u žien v menopauze je však slabá (14). O týchto peptidoch je zatiaľ v literatúre málo údajov, navyše ich metabolizmus a klírens je zatiaľ málo prebádaný.

Ďalšie kostné bielkoviny

Osteonektín a sialoproteín II (BSP) sú dve ďalšie bielkoviny kostí, ktoré uvoľňujú osteoblasty a sú potenciálny-

in poly- and monoclonal antibodies binding individual fragments with different sensitivity. As to validity, sensitivity and reproducibility of osteocalcin determination, the method using two monoclonal antibodies to detect the intact molecule along with N-terminal peptide appears to be the most promising.

In determining osteocalcin, its circadian rhythm should be taken into account with a nightly peak occurring at 4:00 a.m. and a nadir at 5:00 p.m. Bone metabolism is also significantly affected by the menstrual cycle. The highest osteocalcin concentration was established in the luteal period.

Serum osteocalcin correlates with skeletal growth in the period of puberty. It increases in different disturbances of bone metabolism associated with increased bone turnover, e.g. in primary and secondary hyperthyroidism, hyperparathyroidism, and acromegaly (2). Conversely it is decreased in hypothyroidism and hypoparathyroidism, in patients on glucocorticoids, in osteoporosis induced by liver diseases and diabetes, as well as in patients with multiple myeloma and malignant hypercalcemia. Interestingly enough, in Paget's disease osteocalcin concentration exhibits a much slower increase than does the value of the bone isoenzyme of alkaline phosphatase. Increased serum osteocalcin concentrations are found also in some forms of osteoporosis, though the increase is mostly within normal limits. Pathologically increased concentrations were found in postmenopausal women with rapid bone loss. Measurements of undercarboxylized osteocalcin appear to have a high prognostic value for hip fracture in elderly women (21).

Procollagen I peptides

The collagen precursor in biosynthesis is procollagen, whose molecule is by about 50 % larger than that of collagen. Procollagen has additional peptides on its N- and C-terminal, referred to as amino- (PINP) and carboxyterminal propeptides (PICP) (Fig. 1). Before the formation of collagen fibrils, these terminal peptides are split proteolytically and released into the circulation. The procollagen I carboxyterminal propeptide — PICP — is determined in serum as a marker of osteoformation. PICP is a glycoprotein with a molecular weight of about 100,000. In postmenopausal women its value increases, though it usually does not exceed 20 % of the baseline concentration. Estrogen-gestagen therapy reduces serum PICP concentration (11). Glucocorticoids exert a similar effect. The concentration of PICP drops by one half 48 hours after prednisone (60 mg) administration. Only a weak correlation was however found in postmenopausal women between PICP concentration and the histomorphometric parameters of bone formation (14). Literature data on these peptides, their clearance and metabolism are scarce.

Other bone protein

Osteonectin and bone sialoprotein II (BSP) are two major bone-related proteins secreted by the osteoblasts. They are potential markers of bone formation. They circulate in blood, and they can be measured there by radioimmunoassay. Unfortunately

mi markermi kostnej formácie. Cirkulujú v krvi, kde sa merajú metódou RIA. Žiaľ trombocyty obsahujú veľké množstvo týchto bielkovín a rušia ich určovanie v sére. Sledovanie týchto markerov je zatiaľ predmetom výskumu.

BIOCHEMICKÉ MARKERY KOSTNEJ RESORPCIE

Plazmová kyslá fosfatáza rezistentná proti tartarátu

Kyslá fosfatáza je lyzozómový enzým nachádzajúci sa v kostiach, prostate, krvných doštičkách, erytrocytoch a slezine. Má niekoľko izoenzýmov, ktoré možno oddeliť elektroforézou, no senzitivita a špecifickosť separácie je malá. Kostný izoenzým rezistentný proti L(+)tartarátu, tzv. kyslá fosfatáza rezistentná proti tartarátu sa do cirkulácie uvoľňuje z osteoklastov a zodpovedá izoenzýmu 5. Meranie enzýmu sa odporúča v plazme, sérové hodnoty sú obyčajne vyššie v dôsledku enzýmu uvoľneného z krvných doštičiek pri zrážaní krvi. Aj stanovenie v plazme má však svoje úskalia: nízka aktivita, nestálosť enzýmu (aktivita enzýmu klesá aj v mrazenej plazme) a prítomnosť inhibítorov. Očakáva sa, že nové imunochemické metódy, ktoré pomocou špecifickej protilátky detegujú bielkovinu enzýmu, prinesú viac informácií o možnostiach jej klinickej aplikácie. Doterajšie merania ukázali, že aktivita enzýmu sa zvyšuje pri hyperparatyreóze, Pagetovej chorobe, vertebrálnej osteoporóze (16) a po chirurgickom odstránení vaječníkov (19).

Hydroxyprolín v moči

Hydroxyprolín predstavuje približne 13 % celkového aminokyselinového zloženia kolagénu. Tvorí sa posttranslačnou hydroxyláciou prolínu v kolagénovom refazci. Hydroxyprolín, ktorý sa tvorí pri degradácii kolagénu, sa nemôže reutilizovať pre jeho biosyntézu. Navyše až polovica celkového kolagénu sa nachádza v kostiach, kde sa metabolizuje rýchlejšie ako v iných tkanivách, preto sa hydroxyprolín považuje predovšetkým za marker kostnej resorpcie. Hydroxyprolín obsahuje aj zložka komplementu C1q a pri reumatoidnej artritíde a iných zápalových ochoreniach by sa nemalo zabúdať na to, že až 40 % hydroxyprolínu v moči môže pochádzať z C1q. Hydroxyprolín v telových tekutinách môže byť voľný alebo peptidicky viazaný. 90 % hydroxyprolínu, ktorý sa uvoľňuje po degradácii rôznych tkanív a najmä po resorpcii kostného matrixu, cirkuluje v krvi, odkiaľ sa filtruje a reabsorbuje obličkami. Väčšina voľného hydroxyprolínu sa v pečeni oxiduje na oxid uhličitý a močovinu. Do moču sa dostáva len približne 10 % celkového hydroxyprolínu vznikajúceho pri degradácii kolagénu.

Spektrofotometrické metódy, ako aj vysokoúčinná kvapalinová chromatografia pri určovaní hydroxyprolínu vychádzajú z hydrolyzovaného moču a určujú jeho celkové množstvo. Hydroxyprolín patrí aj dnes k štandardným, finančne menej náročným metódam sledovania osteoresorp-

ly, platelets contain significant amounts of these proteins, which disturb the determination of these proteins in serum. Determination of these markers is a subject of current research.

BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE RESORPTION

Plasma tartrate-resistant acid phosphatase

Acid phosphatase is a lysosomal enzyme present in bones, blood platelets, erythrocytes, in the prostate and spleen. It has several isoenzymes, which can be separated electrophoretically, yet the separation sensitivity and specificity is only low. The bone isoenzyme resistant to L(+)tartrate, the so-called tartrate-resistant acid phosphatase, is released into the circulation from osteoclasts and presents isoenzyme 5. Plasma measurements are recommended for determining enzymatic activity, since serum values tend to be higher due to the enzyme released from blood platelets during the clotting process. Measurements in plasma, however, also have their pitfalls: low activity, instability of the enzyme (the enzymatic activity keeps decreasing even in frozen plasma), and the presence of inhibitors. New immunochemical methods, which detect the enzyme protein by means of a specific antibody, are expected to yield useful information for clinical application. Measurement of enzymatic activity have so far shown elevated values in hyperparathyroidism, Paget's disease, vertebral osteoporosis (16) and after oophorectomy (20).

Hydroxyproline in urine

Hydroxyproline represents approximately 13 % of the amino acid content of collagen. It is generated by post-translational hydroxylation of proline occurring within peptide chain. Hydroxyproline yielded during the degradation of collagen can not be reutilized for its synthesis. Moreover, up to one half of total collagen is in the bones where its turnover is probably faster than in other tissues and thus hydroxyproline is regarded to be primarily a marker of bone resorption. The C1q component of the complement also contains hydroxyproline and in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases C1q can be the source of up to 40 % of hydroxyproline in the urine. In body fluids, hydroxyproline may occur both in its free and peptide-bound form. As much as 90 % of hydroxyproline released by the breakdown of collagen in the tissues and especially during bone resorption is in the blood circulation from where it is filtered and reabsorbed by the kidneys. The major part of hydroxyproline is oxidized in the liver and degraded to carbon dioxide and urea. Only approximately 10 % of total hydroxyproline yielded by collagen degradation is excreted in the urine.

Spectrophotometric assays as well as high pressure liquid chromatography used in determination of hydroxyproline are usually based on a hydrolyzed urine sample and therefore reflect the total excretion of hydroxyproline. Hydroxyproline is

cie. Postupne ho však nahrádzajú citlivejšie a špecifickejšie markery typu pyridinolinových zlúčenín. Nevýhodou určovania hydroxyprolínu je aj to, že metóda vyžaduje aspoň 24 hodín trvajúcu diétu (vysoký obsah kolagénu obsahujú najmä mäso, šlachy a chrupky), pretože obsah kolagénu v potrave môže ovplyvniť jeho koncentráciu v moči.

Hydroxylyzínové glykozidy v moči

Hydroxylyzín sa v kolagéne nachádza v glykozylovanej forme a po degradácii kolagénu sa do moču dostávajú glykozidy hydroxylyzínu. Pomer galaktozylhydroxylyzínu a glukozylgalaktozylhydroxylyzínu je však v jednotlivých tkanivách rozdielny. Galaktozylhydroxylyzín je zastúpený prevažne v kostiach. Jeho koncentrácia v moči sa s vekom zvyšuje a zvýšené hodnoty sa namerajú aj pri osteoporóze (13). V klinickej praxi sa zatiaľ táto metóda nerozšírila.

Pyridinolinové priečnoväzbové zlúčeniny a peptidy kolagénu

Pyridinolín a deoxypyridinolín, nazývané aj hydroxylyzylpyridinolín a lyzylpyridinolín, sú dve neredukovateľné priečnoväzbové zlúčeniny kolagénu (5). Vznikajú z lyzínových a hydroxylyzínových zvyškov kolagénu a sú charakteristické pre kolagén a elastín (obr. 2). Molekula kostného kolagénu typu I obsahuje dva reťazce $\alpha_1(I)$ a jeden reťazec $\alpha_2(I)$, ktoré spolu vytvárajú špirálu (α hélix) krátkymi nehélixovými úsekmi na oboch koncoch molekuly (obr. 1). Tieto krátke koncové úseky, tzv. telopeptidy sú dôležitým miestom, kde sa vytvárajú stabilizujúce intermolekulové a intramolekulové priečne väzby. Intermolekulové priečne väzby pyridinolinového typu sa tvoria na oboch koncoch molekuly, ako sa však ukázalo viac na N-koncových telopeptidoch. Tieto trojvalentné zlúčeniny spájajú dva reťazce α susedných molekúl kolagénu (prednostne dva reťazce $\alpha_2(I)$), pričom ďalšie väzbové miesto zasahuje do špirálovej domény kolagénu. Koncentrácia pyridinolínu a deoxypyridinolínu v spojivovom tkanive je veľmi nízka a mení sa podľa druhu tkaniva (4). Priečne väzby pyridinolinového a deoxypyridinolinového typu sa vyskytujú v kostnom kolagéne typu I, v chrupkovom kolagéne typu II a v kolagénach typu III a IX. Pomer deoxypyridinolínu k pyridinolínu 1:3,5 je najvyšší v kostnom kolagéne. V ostatných kolagénach je tento pomer menší ako 1:10. Preto sa deoxypyridinolín považuje za špecifickejší marker kostnej resorpcie ako pyridinolín. Pyridinolín a deoxypyridinolín sa vylučujú do moču voľné (približne 40 %) alebo peptidicky viazané (približne 60 %). Vylučovanie má určitý denný rytmus a pokles v koncentrácii medzi 6. hodinou ráno a 12. hodinou na obed môže byť až 30 %. Odbery moču by sa preto mali štandardizovať. Hodnoty v prvom rannom moči a v druhom rannom moči signifikantne korelujú a podstatne sa nelíšia.

Väčšina údajov týkajúcich sa pyridinolínu a deoxypyridinolínu sa namerala metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (metódou HPLC). Táto metóda je síce veľmi

a traditional, still largely used and cost-effective indicator of osteoresorption. However, it is gradually substituted by more sensitive and more specific markers of the pyridinoline-related compounds. A disadvantage of hydroxyproline assay lies in the need of at least 24-hour diet, since the food rich in collagen could influence its concentration in the urine (meat, tendons and cartilage contain high amount of collagen).

Hydroxylysine glycosides in urine

In collagen, hydroxylysine occurs in glycosylated form and, following collagen degradation, glycosides of hydroxylysine reach the urine. However, the ratio of galactosyl hydroxylysine and glucosyl-galactosyl hydroxylysine in individual tissues differs. Galactosyl hydroxylysine occurs predominantly in bones. Its concentration increases with age and elevated values were found also in osteoporosis (13). In clinical practice, this method has not been widely used so far.

Pyridinoline crosslinks compounds and associated peptides

Pyridinoline and deoxypyridinoline, called also hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline, are two non-reducible cross-linked compounds of collagen (5). They are generated from lysine and hydroxylysine collagen residues and are unique for collagen and elastin (Fig. 2). The bone type I collagen molecule contains two α_1 chains and one α_2 chain, which together constitute a helix with short non-helix segments at both ends of the molecule (Fig. 1). These short terminal segments, called telopeptides, are an important site of production of stabilizing inter- and intramolecular cross-links. Intermolecular cross-links of the pyridinoline type are formed at both ends of the molecule, yet predominantly on the N-terminal telopeptides. These trivalent compounds join two α chains of vicinal collagen molecules, with a further binding site in the helical domain of another molecule. The concentration of pyridinoline and deoxypyridinoline is very low in connective tissue and changes with the tissue type (4). Cross-links of pyridinoline and deoxypyridinoline type occur in type I bone collagen, in type II cartilage collagen, and in types III and IX collagen. The highest ratio of deoxypyridinoline to pyridinoline of 1:3.5 is found in bone collagen. In other collagen types, this ratio is less than 1:10. Deoxypyridinoline is thus considered to be a more specific marker of bone resorption than pyridinoline. Both pyridinoline and deoxypyridinoline are excreted into urine either in the free form (approximately 40 %) or peptide-bound (approx. 60 %). Excretion undergoes a circadian rhythm and the concentration drop between 6:00 a.m. and 12:00 a.m. may amount to 30 %. Urine sample collecting should therefore be standardized. The values obtained in the first and second morning urine are highly correlated and not significantly different.

The majority of data on pyridinoline and deoxypyridinoline was obtained by high performance liquid chromatography

citlivá a objektívna, no pre klinickú biochémiu zdĺhavá. V poslednom čase sa vypracovalo niekoľko efektívnych imunochemických metód s protilátkami namierenými proti voľnému pyridinolínu (Pyrilink™) a deoxypyridinolínu (PyrilinkD™) od firmy Metra (USA). Ďalšie metódy pracujú s protilátkami viažúcimi rôzne peptidové fragmenty telopeptidov z lokality priečnych väzieb. Komerčne prístupný kit Osteomark^R NTx (Ostex International, USA) deteguje peptidový priečnoväzbový fragment z N-koncového telopeptidu pochádzajúceho z refazca $\alpha_2(I)$ kolagénu. Špecifickosť metódy zvyšuje skutočnosť, že tento fragment, ktorý sa ďalej nemetabolizuje, je charakteristickým produktom osteoklastovej degradácie kolagénu a odráža aktuálnu, celkovú aktivitu osteoklastov v tele (1, 18). NTx veľmi rýchlo a výrazne odpovedá na antiresorpčnú terapiu. CrossLaps™ (Osteometer, Dánsko) pracuje s protilátkou namierenou proti syntetickému peptidu so sekvenciou aminokyselín, ktorá je špecifická pre C-telopeptid $\alpha_1(I)$ refazca kolagénu. Výhodou všetkých týchto metód je štandardná technika ELISA, ľahká prispôbitelnosť bez predchádzajúcej úpravy moču. Sérová imunorádioizotopová metóda (ICTP) od firmy Orion Diagnostika (Fínsko) deteguje C-telopeptidovú priečnoväzbovú doménu kostného kolagénu typu I. Ukazuje sa však, že tento marker nie je dostatočne citlivý na sledovanie malých zmien v kostnom metabolizme a s ďalšími markermi kostnej resorpcie koreluje slabo (12).

Klinický význam týchto markerov sa môže líšiť, preto je potrebné ich pri rôznych kostných chorobách najskôr overiť. Ukazuje sa, že imunochemicky stanovené hodnoty voľného deoxypyridinolínu, NTx a CrossLaps sa zvyšujú po menopauze (30–40 %) a sú signifikantne vyššie u žien tzv. „fast losers“. Vyššie hodnoty sa namerali aj u pacientov s hypertyreózou, primárnou hyperparatyreózou a Pagetovou chorobou (8, 12, 17). Po antiresorpčnej liečbe estrogénmi a bifosfonátmi sa znižujú.

Prognostická hodnota biochemických markerov kostného metabolizmu a ich využitie v diagnostike a terapii osteoporózy

Moderné denzitometrické techniky a biochemické markery kostného obratu poskytujú dôležité informácie o aktuálnom množstve kostnej hmoty a úrovni kostného metabolizmu. V klinickej praxi sa tieto metódy navzájom dopĺňajú. Denzitometria poskytne kvantitatívne údaje o momentálnom stave skeletu, o jeho hustote, biochemické markery vypovedajú o intenzite a smere kostnej remodelácie. Na to, aby sa mohla posúdiť zvýšená aktivácia kostného metabolizmu a pomer resorpcia—novotvorba sa obyčajne pracuje s ukazovateľmi kostnej resorpcie aj formácie. Každý z nich vypovedá o intenzite určitého čiastkového deja: o tvorbe kolagénu (propeptid kolagénu), syntéze nekolagénových bielkovín a mineralizácii (osteokalcín), o degradácii kolagénu a anorganickej zložky (hydroxyprolín, pyridinolino-

(HPLC). This method is very sensitive and reliable but it is too time demanding for clinical biochemistry. The Metra company (USA) has recently developed some effective immunoassays with antibodies directed against free pyridinoline (Pyrilink™) and deoxypyridinoline (PyrilinkD™). Further methods use antibodies directed against different peptide fragments from the cross-linking locality of telopeptides. The commercially available kit Osteomark^R NTx (Ostex International, USA) detects the cross-linked peptide fragment from the N-terminal telopeptide-to-helix derived from the $\alpha_2(I)$ chain of collagen. This fragment, which does not further metabolize, is a typical product of osteoclast degradation of collagen and it reflects the given total osteoclast activity in the body (1, 18). NTx yields a rapid and marked response to antiresorptive therapy. CrossLaps™ (Osteometer, Denmark) uses the antibody directed against the synthetic peptide with an amino acid sequence specific for a part of C-telopeptide $\alpha_1(I)$ of the collagen. The advantages of such immunoassays lie in the standard ELISA technique and the easy adaptability requiring no urine pre-treatment. The serum radioimmunoassay (ICTP) available from the company Orion Diagnostika (Finland) detects the C-telopeptide cross-linked domain of bone collagen type I. This marker, however, has failed to prove sensitive enough for studying small changes in bone metabolism and correlates only weakly with other markers of bone resorption (12).

Since the clinical value of the above given markers may differ, they have first to be verified in each bone disorder. It appears, that the values of free deoxypyridinoline determined immunochemically by NTx and CrossLaps increase by approximately 30–40 % after menopause and significantly higher values were determined in so-called “fast loser” women. In patients with hyperthyroidism, primary hyperparathyroidism and Paget’s disease the values were also reported to be higher (8, 12, 18). After antiresorptive therapy with estrogens and bisphosphonates the values decrease.

Biochemical markers of bone metabolism — their prognostic value and use in the diagnosis and therapy of osteoporosis

Modern densitometric techniques and biochemical markers of bone turnover provide important information on the given amount of bone mass and on the level of bone turnover. In clinical practice these methods are mutually complementary. Densitometry yields quantitative data on the given state of the skeleton and its density, while biochemical markers are indicative of the intensity and direction of bone remodeling. To assess the enhanced activation of bone metabolism and osteoresorption-osteof ormation rate, indicators of both the former and the latter process have to be taken into account. Each of them yields information about the intensity of a specific process: on collagen formation (collagen propeptide), synthesis of non-collagenous proteins and mineralization (osteocalcin), the degradation of collagen and bone

vé zlúčeniny, vápnik). V praxi sa osvedčili ako markery osteoformácie osteokalcín a kostný izoenzým alkalické fosfatázy a na zhodnotenie osteoresorpcie sa používajú pyridinolínové zlúčeniny, často ešte aj dnes hydroxyprolín.

Zánik funkcie vaječníkov u žien po menopauze (1—3 roky) má za následok dramatické zrýchlenie kostného obratu. Zvyšujú sa markery nielen kostnej resorpcie, ale aj kostnej formácie. Vystupňovanie kostného obratu je však veľmi individuálne. Približne 30 % žien patrí medzi tzv. “fast losers” (ženy s rýchlym úbytkom kostnej hmoty) s extrémne vystupňovaným kostným obratom a výraznou prevahou osteoresorpcie, u ktorých ročný úbytok kostnej hmoty môže byť až 6 %. Ukazuje sa, že medzi rýchlosťou kostného obratu a stratou kostnej hmoty u postmenopauzálnych žien je priama úmera. 2—4-ročné sledovanie neliečených žien ukázalo, že zvýšené hodnoty osteokalcínu, pyridinolínu a hydroxyprolínu merané na začiatku štúdie veľmi dobre korelovali s denzitometricky zistenou stratou kostnej hmoty na konci štúdie (9). Aj dlhodobé štúdie potvrdili väčší rozsah straty kostnej hmoty a zvýšený počet fraktúr u žien identifikovaných ako “fast losers” na základe biochemických meraní. Biochemické markery sa osvedčili pri monitorovaní antiresorpcnej liečby u individuálnych pacientov, umožňujú sledovať odpoveď pacienta na liečbu a stanoviť minimálnu účinnú dávku (estrogény, bifosfonáty). Biochemické markery signalizujú zmeny už po 3—6 mesiacoch (markery osteoresorpcie reagujú skôr ako markery osteoformácie), kým na denzitometrické hodnotenie sa musí čakať aspoň rok. Po hormonálnej terapii sa markery osteoformácie a osteoresorpcie výrazne znižujú. Už po 3—6 mesiacoch dosahujú hodnoty premenopauzálnych žien. Denzitometrické merania po roku ukazujú jasnú pozitívnu koreláciu medzi poklesom hodnôt biochemických ukazovateľov a prevenciou straty kostnej hmoty (3, 21). Krátkodobé štúdie s bifosfonátmi (aledronatom) svedčia o závislosti medzi dávkou podávaného lieku, poklesom biochemických ukazovateľov a ochranou kostnej hmoty pred úbytkom (10). Ukazuje sa, že priaznivý účinok kalcitonínu na nárast kostnej hmoty sa prejavuje najmä u žien so zvýšenou rýchlosťou kostného metabolizmu.

Ako rizikový faktor vzniku zlomenín u starších žien sa ukazuje zvýšená koncentrácia dekarboxylovaného osteokalcínu. Výsledky meraní u starších žien so zlomeninou krčka femuru ukázali, že u týchto žien na rozdiel od postmenopauzálnych žien je nižšia hodnota osteokalcínu, čo poukazuje na zníženie kostnej formácie. Hodnoty pyridinolínových zlúčenín v moči sú však naopak zvýšené. Zvyšuje sa aj koncentrácia dekarboxylovaného osteokalcínu. Výsledky prospektívnej štúdie starších pacientok zo sociálnych ústavov (18 mesiacov) ukázali, že u pacientok s vyšším obsahom dekarboxylovaného osteokalcínu v sére bol vyšší výskyt fraktúr krčka femuru (20). Predpokladá sa, že častý nedos-

inorganic component (hydroxypoline, pyridinoline compounds, calcium). As markers of osteoformation, osteocalcin and the bone isoenzyme of alkaline phosphatase have proved to be useful in clinical practice, while pyridinoline compounds have served for the assessment of osteoresorption and even hydroxypoline is frequently used at the present time.

Ceasing of ovarian function in women 1—3 years after menopause results in a dramatic acceleration of bone turnover. Not only the increase of the makers of bone resorption, but also those of bone formation was observed. The enhancement of bone turnover is, however, determined individually. Approximately 30 % of women are so-called fast losers (women with a rapid loss of bone mass) with extremely accelerated bone turnover rate and marked predominance of osteoresorption, whose loss in body mass may amount to 6 % per year. A direct correlation was established between increased bone turnover and body mass loss in postmenopausal women. Two- and four-year follow-up of untreated women showed a good correlation between increased values of osteocalcin, pyridinoline and hydroxypyridinoline established at the beginning of the study and the loss of body mass determined densitometrically at the end of the study (9). Long-term studies also confirmed higher body mass losses and increased number of fractures in women identified as fast losers on the basis of biochemical measurements. Biochemical markers have proved useful in monitoring antiresorptive therapy in individual patients. They allow both study of the patient's response to treatment and establishing of a minimal effective dosage (estrogens, bisphosphonates). Biochemical markers indicate changes as early as within 3—6 months of therapy (markers of osteoresorption responding earlier than those of osteoformation), while densitometric evaluation requires at least one year. Hormone replacement therapy results in a rapid decrease of osteoresorption and osteoformation markers. Premenopausal values can be reached after 3 to 6 months. Densitometric measurements after a year exhibited an unequivocally positive correlation between reduced values of biochemical markers and prevention of bone mass loss (3, 22). Short-term studies of bisphosphonate therapy (alendronate) provided evidence of a relation between the dosage of the drug administered, decrease in the values of biochemical markers and the protection against loss of bone mass (10). The beneficial effect of calcitonin on bone mass increase appears to become manifest particularly in women with high bone turnover.

Raised concentrations of undercarboxylated osteocalcin were found to be a risk factor of fracture development in elderly women. Unlike postmenopausal women, measurements in elderly women with hip fracture showed lower osteocalcin values, indicative of reduced osteoformation. The values of urinary pyridinoline compounds, on the other hand, were increased, along with elevated concentrations of undercarboxylated osteocalcin (3). Results of a prospective study of elderly institutionalized women (18 months) showed that pa-

tatok vitamínu K v staršom veku, ktorý je nepostrádateľným faktorom karboxylácie osteokalcínu, je hlavnou príčinou tohto fenoménu (15).

Biochemický skríning spolu s densitometrickým meraním pri osteoporóze slúžia predovšetkým na to, aby sa medikamentózna liečba a celá komplexná "antiporotická" terapia zameraná na prevenciu rozvoja porotického procesu začala čo najrýchlejšie po jeho nástupe. Včasná terapia umožňuje osteoporotický proces nielen brzdiť, ale môže priniesť aj merateľný prírastok kostnej denzity. Diagnostická hodnota biochemických markerov je však relatívna a mali by sa vždy hodnotiť spolu s výsledkami klinických vyšetrení, ďalších laboratórnych testov, röntgenového, príp. densitometrického vyšetrenia alebo výsledkami vyšetrenia kostnej biopsie.

LITERATÚRA

1. Apone, S., Fevold, K., Lee, M., Eyre, D.: A rapid method for quantifying osteoclast activity in vitro. *J Bone Miner Res*, 9, 1994, Suppl. 1, s. 178—183.
2. Delmas, P.D.: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic disease. *Endocrin Metab Clin North Amer*, 19, 1990, s. 1—18.
3. Delmas, P.D.: Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. *Amer J Med*, 91, 1991, s. 59S—63S.
4. Eyre, D.R.: The specificity of collagen cross-links as markers of bone and connective tissue degradation. *Acta Orthop Scand*, 66, 1995, Suppl. 266, s. 166—170.
5. Fujimoto, D., Moriguchi, T., Ishuda, T., Hayashi, H.: The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem Biophys Res Comm*, 84, 1978, s. 52—57.
6. Garnero, P., Delmas, P.D.: Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 77, 1993, s. 1046—1053.
7. Garnero, P., Grimaux, M., Seguin, P., Delmas, P.D.: Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*, 9, 1994, s. 255—264.
8. Garnero, P., Gineys, E., Riou, J.P., Delmas, P.D.: Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 3, 1994, s. 780—785.
9. Hanson, D.A., Weiss, M.A.E., Bollen, A.M., Maslan, S.L., Singer, F.R., Eyre, D.R.: A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen crosslinked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res*, 7, 1992, s. 1251—1258.
10. Harris, E.T., Gertz, B.J., Genant, H.K. a spol.: The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 76, 1993, s. 1399—1403.
11. Hasling, C., Eriksen, E.F., Melkko, J., Ristelli, L., Charles, P., Moskilde, L., Ristelli, J.: Effects of combined estrogen-gestagen regimen on serum levels of the carboxy-terminal propeptide of human type I procollagen in osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 6, 1991, s. 1295—1300.
12. Hassager, C., Colwell, A., Assiri, A.M.A., Eastell, R., Russell, R.G.G., Christiansen, C.: Effect of menopause and hormone replacement therapy on urinary excretion of pyridinium cross-links: a longitudinal and cross-sectional study. *Clin Endocrin*, 37, 1992, s. 45—50.
13. Moro L., Pozzi Mucelli, R.S., Gazzarrini, C., Modricky, C., Marrotti F., deBernard, B.: Urinary beta-1-galactosyl-O-hydroxylysine (GH) as a marker of collagen turnover of bone. *Calcif Tissue Int*, 42, 1988, s. 87—90.
14. Parfitt, A.M., Simon, L.S., Villanueva, A.R., Krane, S.M.: Procollagen type I carboxyterminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res*, 2, 1987, s. 427—436.
15. Plantalech, L., Guillaumont, M., Leclercq, M., Delmas, P.D.: Impaired carboxylation of serum osteocalcin in elderly women. *J Bone Miner Res*, 6, 1991, s. 1211—1216.
16. Price, C.P., Kirwan, A., Vader, C.: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clin Chem*, 41, 1995, s. 641—643.
17. Robins, S.P., Woitge, H., Hesley, R., Ju, J., Seyedin, S., Seibel, M.J.: Direct enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res*, 9, 1994, s. 1643—1649.
18. Seyedin, S.M.: Diagnostic approaches to connective tissue diseases. *Acta Orthop Scand*, 66, 1995, Suppl. 266, s. 165—170.
19. Štepán, J.J., Pospíchal, J., Presl, J., Pacovský, V.: Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. *Bone*, 8, 1987, s. 279—84.
20. Szulz, P., Chapuy, M.C., Meunier, P.J., Delmas, P.D.: Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest*, 91, 1993, s. 1769—1774.
21. Uebelhart, D., Schlemmer, A., Johansen, J., Gineys, E., Christiansen, C., Delmas, P.D.: Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium crosslinks. *J Clin Endocrinol Metab*, 72, 1991, s. 367—373.
22. Van Straalen, J.P., Sanders, E., Prummel, M.F., Sanders, G.T.B.: Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta*, 201, 1991, s. 27—34.

Do redakcie došlo 12.11.1996.

Adresa autorky: Ing. M. Stančíková, CSc., Výskumný ústav reumatických chorôb, Nábřežie I. Krasku 4, 921 01 Piešťany, Slovensko.