

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo: dalla biologia all'utilizzo clinico (Rassegna)

Cinzia Callà¹, Franca Pagani²

¹Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Laboratorio Analisi I, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Fondazione Poliambulanza Istituto Ospedaliero, Brescia

BIOCHIMICA DEL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è formato da due costituenti principali: le cellule e la matrice extracellulare^{1,2}. Comparata ad altri tessuti la matrice extracellulare ossea è unica in quanto è costituita da una fase organica strettamente associata ad una fase minerale. La fase organica è costituita per circa il 90% da collagene di tipo I e da proteine non-collagene. Il collagene di tipo I non è specifico per il tessuto osseo in quanto si trova anche nella cute, nei legamenti, e nei tendini. Tuttavia, sebbene la struttura primaria sia la stessa, in tessuti diversi la stessa molecola di collagene subisce alcune modificazioni post-traduzionali che conferiscono caratteristiche di tessuto-specificità. Il collagene di tipo I è una proteina formata da tre filamenti di circa 1000 aminoacidi ciascuno, avvolti l'uno sull'altro a formare un'alfa elica³. Esso viene sintetizzato sotto forma di precursore, il procollagene. Il procollagene viene escreto dalla cellula nella matrice dove i due estremi globulari vengono rimossi ad opera di enzimi specifici, con la conseguente formazione di collagene che, privo delle estremità globulari, precipita nella matrice ossea, e va incontro a differenti processi di maturazione. Un processo di tipo enzimatico coinvolge la lisina ossidasi che provoca l'ossidazione di residui di lisina e di idrossilisina, in seguito all'unione dei residui ossidati si formano dei legami crociati di tipo covalente tra le alfa catene della stessa molecola e tra molecole adiacenti. Accanto a questo processo meccanismi non enzimatici portano alla formazione di prodotti finali di glicazione e a fenomeni di racemizzazione e isomerizzazione a livello delle estremità terminali della molecola. Queste modificazioni forniscono rigidità alla struttura del tessuto ed aumentano la resistenza del tessuto stesso quando sottoposto a forti tensioni. Il collagene depositato nella matrice ossea è strettamente legato alle altre proteine non-collagene e, dopo un certo intervallo di tempo dalla sua deposizione, va incontro a completa mineralizzazione.

Le cellule ossee importanti dal punto di vista della produzione dei marcatori biochimici sono rappresentate da osteoblasti e osteoclasti. Gli osteoblasti, cellule di derivazione mesenchimale, sono deputate alla produzione ed alla deposizione dei componenti organici della matrice. Inoltre, attivano il processo di riassorbimento di vecchio tessuto osseo^{1,2}. Gli osteoclasti, grosse cellule multinucleate derivanti da cellule pluripotenti della famiglia dei monociti/macrofagi, sono deputate al riassorbimento del tessuto osseo^{1,2}. Quando attivati, gli osteoclasti si presentano come cellule polarizzate, con una zona apicale contenente prevalentemente i nuclei della cellula, ed una zona basale caratteristicamente frastagliata (*ruffled border*) adesa alla superficie della matrice ossea. Gli osteoclasti sono dotati di specializzate strutture di adesione dette podosomi che permettono di delimitare l'area di tessuto osseo in cui avverrà

il riassorbimento, impedendo di danneggiare il circostante nuovo tessuto appena formato. In questo compartimento l'osteoclasto pompa, attraverso canali ionici, ioni idrogeno e cloro riducendo il pH fino a 5 ed enzimi proteolitici quali fosfatasi acida, anidrasi carbonica e catepsina K. Come risultato l'osteoclasto lascia una lacuna che in seguito viene riempita da nuova matrice ossea prodotta dagli osteoblasti.

Il tessuto osseo è sottoposto ad un continuo rimaneggiamento⁴. Il processo avviene in unità ben definite conosciute come *Bone Metabolic Unit* (BMU). Il rimaneggiamento osseo presenta caratteristiche ben diverse a seconda delle fasi della vita. Dalla nascita e per tutto il periodo della crescita l'attività degli osteoblasti è separata dall'attività degli osteoclasti sia temporalmente che spazialmente. Come conseguenza la formazione eccede il riassorbimento e le ossa aumentano la loro massa ed assumono forma e struttura dello scheletro adulto. Intorno ai 20 anni di età, per entrambi i sessi circa il 95% della massa ossea si è sviluppata, il restante viene completato intorno a 28-36 anni. Il livello finale di massa ossea raggiunto a questo punto della vita determina il picco di massa ossea. L'entità di questo picco è importante perché è correlata al rischio di sviluppare osteoporosi nell'età avanzata. Dopo il raggiungimento della maturità scheletrica, l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti è, in situazioni fisiologiche, "accoppiata". Il bilancio formazione/riassorbimento è in equilibrio con mantenimento della massa scheletrica. In seguito a variazioni ormonali o di altra natura, a partire dal periodo perimenopausale nelle donne e dalla quinta decade di vita negli uomini, il bilancio tra attività degli osteoclasti e attività degli osteoblasti può essere negativo con prevalenza del riassorbimento sulla formazione e progressiva perdita di massa ossea. Il processo di rimodellamento osseo si completa in un periodo che va da tre a quattro mesi. Il processo inizia con il reclutamento delle cellule precursori degli osteoclasti al sito di riassorbimento, sotto l'azione di citochine e fattori di crescita locali⁵⁻⁷. Gli osteoblasti giocano un ruolo importante nell'osteoclastogenesi attraverso la produzione di fattori stimolanti, di *Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB Ligand* (RANKL) e di osteoprotegerina, quest'ultima, contrastando l'azione di RANKL sul suo recettore osteoclastico RANK, impedisce una sovrapproduzione di osteoclasti e di conseguenza inibisce il riassorbimento⁸. Segue la fase di riassorbimento di vecchio tessuto osseo attraverso l'azione degli osteoclasti come descritto precedentemente⁹. La fase successiva è costituita dalla formazione di nuovo tessuto osseo ad opera degli osteoblasti partendo dalla formazione di osteoide fino alla mineralizzazione della matrice extracellulare¹⁰. Alla fine del processo l'area interessata entra in una fase di quiescenza, la lacuna ossea è ora completamente riempita con nuovo tessuto, e rimarrà quiescente fino al momento in cui ricomincerà

cerà nella stessa sede un nuovo ciclo di rimodellamento. Le diverse fasi del rimodellamento osseo sono controllate da numerosi fattori sistemici e locali. I fattori sistemici includono gli ormoni calciotropi (paratormone, calcitonina, vitamina D), gli ormoni sessuali e i glucocorticoidi¹¹⁻¹³. Questi possiedono un'attività modulatrice sulla crescita e la differenziazione degli osteoblasti e degli osteoclasti. I fattori locali includono fattori di crescita, citochine, prostaglandine e leucotrieni¹⁴⁻¹⁵. Il ruolo di questi fattori è molto complesso perché nessuno di questi agisce indipendentemente e molti agiscono in sinergia.

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo possono essere classificati in base al processo di cui sono il prodotto in marcatori di formazione ossea, prodotti dall'attività

degli osteoblasti, e marcatori di riassorbimento, prodotti dall'attività degli osteoclasti. Le principali caratteristiche biochimiche, analitiche e le principali fonti di variabilità sono riassunte nelle tabelle 1 e 2.

MARCATORI DI FORMAZIONE OSSEA

Fosfatasi Alcalina ossea

La fosfatasi alcalina (ALP) è un enzima ubiquitario, presente sulla superficie esterna di tutte le membrane, rendendo plausibile l'ipotesi che l'enzima sia implicato nel trasporto di specifiche sostanze attraverso la membrana

Tabella 1

Marcatore Riassorbimento	Nome completo	Origine	Dosaggio	Commenti
u-NTX	Telopeptide terminale del collagene I urinario	Idrolisi osteoclastica mediata da catepsina K del collagene di tipo I	Automatizzato Manuale	Espresso su valori di creatinina (/Cr). Specificità: collagene di tipo I. Variabilità: ritmo circadiano
s-NTX	Telopeptide N-terminale del collagene I sierico	Idrolisi osteoclastica mediata da catepsina K del collagene di tipo I	Automatizzato Manuale	Specificità: collagene di tipo I. Una scarsa risposta alla terapia può essere dovuta a mancanza di specificità per l'osso. Variabilità: funzione renale; ritmo circadiano
u-CTX	Telopeptide C-terminale del collagene urinario	Idrolisi osteoclastica mediata da catepsina K del collagene di tipo I	Automatizzato Manuale	Espresso su valori di creatinina (/Cr). Specificità: collagene di tipo I. Variabilità: ritmo circadiano. Può essere isomerizzato (β) o non isomerizzato (α) su un residuo di acido aspartico: se non specificato si intende nella forma isomerizzata
s-CTX	Telopeptide C-terminale del collagene sierico	Idrolisi osteoclastica mediata da catepsina K del collagene di tipo I	Automatizzato Manuale	Sempre nella forma isomerica (β). Specificità: collagene di tipo I. Variabilità: importante l'ora del prelievo e del pasto (prelievo al mattino a digiuno), funzione renale/epatica, ritmo circadiano
s-ICTP/CTX-MMP	Telopeptide C-terminale del collagene sierico	Idrolisi del collagene di tipo I mediata dalle metallo proteasi della matrice; il frammento è più grande del CTX derivato dalla catepsina K	Manuale	Specificità: collagene di tipo I. Deriva dalla digestione del collagene I da parte delle MMP e non risponde ai trattamenti usuali dell'osteoporosi. Variabilità: ritmo circadiano, funzione renale/epatica
u-DPD	Desossipiridonilina urinaria	Idrolisi proteolitica del collagene maturo; presente nell'osso e nella dentina	Automatizzato Manuale	Espresso su valori di creatinina (/Cr). Totale o libera (non legata a peptidi). Specificità: presente prevalentemente nel collagene maturo dell'osso. Variabilità: indipendente dalla dieta, ma influenzata da ritmo circadiano e radiazioni UV
u-PYD	Piridonilina urinaria	Idrolisi proteolitica del collagene maturo; presente in osso, cartilagine, tendini, vasi sanguigni	Automatizzato Manuale	Espresso su valori di creatinina (/Cr). Totale o libera (non legata a peptidi). Specificità: presente prevalentemente nel collagene maturo di osso e cartilagine. Variabilità: indipendente dalla dieta, influenzata da ritmo circadiano, radiazioni UV, artrite e funzionalità epatica
s-TRAPC	Fosfatasi acida tartrato resistente	La frazione elettroforetica 5 è suddivisibile in 2 isoforme (a e b): il tipo 5b ha origine osteoclastica	Manuale	Variabilità: emolisi, coagulazione e ritmo circadiano. Difficoltà nella conservazione, stabile fino a 2 anni a -70°C

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo: utilizzo nella pratica clinica

cellulare nello spazio extracellulare. Ancora oggi non è chiara la sua funzione, ma è noto che l'enzima abbia un ruolo importante nella formazione dell'osso e nel processo di mineralizzazione¹⁶.

La concentrazione sierica dell'ALP consiste di un gruppo di isoforme differenti prodotte da vari tessuti (fegato, osso, intestino, milza, rene, placenta). Tali isoforme sono codificate da quattro loci genetici, che includono tre geni tessuto specifici ed uno non tessuto specifico, posti sul cromosoma 1. Il locus genetico epatico/osseo/renale codifica per la ALP non specifica, che si trova nelle cellule epatiche, negli osteoblasti e nelle cellule renali. Le fosfatasi essendo codificate dallo stesso gene e presentando la stessa natura proteica non potrebbero essere designate

come isoenzimi, tuttavia, andando incontro a modificazioni postsintetiche di glicosilazione e sialilazione specifiche, a seconda del tessuto interessato, danno origine a tre distinte isoforme, l'ossea, l'epatica, l'intestinale, che possiedono caratteristiche chimico-fisiche diverse¹⁷.

In un soggetto adulto sano, circa il 50% della attività dell'enzima nel siero origina dal fegato, mentre il rimanente 50% è di derivazione ossea, con un rapporto di 1/1; nei bambini e negli adolescenti tale rapporto è modificato dall'accrescimento osseo con una elevata concentrazione sierica di ALP ossea (BAP), che rappresenta circa il 90% della totale attività¹⁸.

La fosfatasi alcalina ossea è prodotta dagli osteoblasti e catalizza l'idrolisi degli esteri di fosfato aumentando la

Tabella 2

Marcatore Formazione	Nome completo	Origine	Dosaggio	Commenti
s-OC	Osteocalcina sierica	Proteina legante l'idrossiapatite sintetizzata da osteoblasti, odontoblasti e condrociti. In parte liberata in circolo anche durante riassorbimento osseo	Automatizzata Manuale	Specificità: la OC sierica è quasi interamente di origine osteoblastica. Subisce carbosilazione post-traduzionale vitamina K dipendente. In circolo è presente in forma intatta e come frammenti derivanti da idrolisi sierica e riassorbimento osseo. Variabilità: funzione renale e ritmo circadiano; variazioni interlaboratorio; elevata instabilità in vitro
u-OC	Osteocalcina urinaria	Proteina legante l'idrossiapatite sintetizzata da osteoblasti, odontoblasti e condrociti. In parte liberata in circolo anche durante riassorbimento osseo	Manuale	Espresso su valori di creatinina (/Cr). Specificità: la OC sierica è quasi interamente di origine osteoblastica; la molecola intatta e gli eterogenei frammenti di degradazione vanno incontro a rapida eliminazione renale. Variabilità: funzione renale e ritmo circadiano
s-BALP	Fosfatasi alcalina ossea	Enzima tetramerico espresso sulla membrana osteoblastica; l'isoforma ossea deriva da modifiche post-traduzionali del prodotto del gene tessuto aspecifico	Automatizzata Manuale	Specificità: l'isoforma ossea è specifica per l'osso ma, tralasciando le metodiche elettroforetiche, la determinazione immunometrica anche con MoAb registra cross-reattività verso isoforma epatica (fino al 20%). Variabilità: minima variazione circadiana
s-PICP	Propeptide C terminale del procollagene I	Frammento derivato dal precursore della molecola di collagene di tipo I sintetizzata dagli osteoblasti	Manuale	Specificità: la maggior parte deriva dall'osso (90%); in misura minore da altri tessuti, soprattutto cute. Emivita plasmatica breve. Regolazione del catabolismo epatico da parte di ormoni e fattori di crescita.
s-PINP	Propeptide N terminale del procollagene I	Frammento derivato dal precursore della molecola di collagene di tipo I sintetizzata dagli osteoblasti	Automatizzata Manuale	Specificità: la maggior parte deriva dall'osso (90%); in misura minore da altri tessuti, soprattutto cute. Saggio immunologico può riconoscere solo il trimero (intatto) o trimero e monomero (totale). Variabilità: ritmo circadiano in minima misura. Catabolismo epatico non influenzato da fattori ormonali.

concentrazione di fosforo, necessario al processo di mineralizzazione, e probabilmente potrebbe avere anche un ruolo nel blocco dell'attività riassorbitiva degli osteoclasti.

La ALP è stata ampiamente utilizzata nella pratica clinica quale marcatore del metabolismo dell'osso, ma oggi si preferisce la determinazione della fosfatasi alcalina ossea perché più specifica ed in quanto riflette bene l'attività degli osteoblasti. Le relazioni tra ALP e ormoni sessuali (estrogeni, per esempio), con l'accrescimento osseo, sono responsabili delle differenze correlate al genere: tra maschi e femmine in età adolescenziale il picco di massima attività ossea si posiziona diversamente; nell'uomo rispetto alla donna è presente una maggiore attività della fosfatasi tra i 20 ed i 50 anni (principalmente dovuta a differenze della forma ossea); nella donna in menopausa c'è un incremento dell'attività totale, mantenendo ugual rapporto di concentrazione tra la forma epatica e quella ossea.

Molte tecniche sono state proposte per la separazione delle due principali isoforme circolanti basate su approcci separativi (elettroforesi), non separativi (inattivazione al calore) ed immunochimici. Tali metodiche sfruttano il principio delle differenti proprietà fisico-chimiche delle due forme, dovute alle variazioni del sito di legame dei carboidrati nella catena e al grado di sialilazione. I metodi immunochimici hanno permesso una semplice e rapida quantificazione della attività enzimatica o della massa dell'enzima. Tuttavia queste tecniche mostrano un certo grado di cross-reattività fra la forma ossea e l'epatica (15-20%). Attualmente è stato sviluppato un metodo immunochimico che permette la determinazione della BAP con un sistema automatizzato ad elevata precisione e sensibilità¹⁹. E' consigliato effettuare il dosaggio su campioni di siero.

Osteocalcina

L'Osteocalcina (OC) è una piccola proteina di 5,8 kDa sintetizzata dagli osteoblasti, dagli odontoblasti e dai condrociti ipertrofici. La proteina origina da un pro-peptide di 75 aminoacidi che va incontro a carbossilazione di tre residui di acido glutammico attraverso un processo vitamina K dipendente. Dopo la carbossilazione viene staccata una sequenza di 25 aminoacidi dal pro-peptide e la proteina viene rilasciata dalla cellula. L'elevata affinità dei residui gamma-glutammici per l'idrossiapatite fa ipotizzare un suo coinvolgimento nel processo di mineralizzazione dell'osso. Infatti l'OC di nuova sintesi viene rilasciata dalla cellula in minima parte nel circolo sanguigno mentre, in maggior quantità, viene incorporata nella matrice ossea, rappresentando circa il 15% delle proteine non-collageniche dell'osso. In seguito al riassorbimento osseo viene liberata nel torrente ematico. Interagendo con proteine e recettori di superficie cellulare l'OC gioca un ruolo attivo nell'organizzazione della matrice extracellulare, tuttavia, sebbene conosciuta da più di venti anni, ancora oggi il suo esatto ruolo è da definire. E' stata a lungo considerata solo come un marcatore di formazione dell'osso ma recenti studi hanno rivalutato la sua funzione dandole anche un ruolo endocrino e di regolatore del metabolismo energetico^{20,21}. I livelli sierici di OC, è stato dimostrato, correlano bene con il tasso di formazione ossea, verificato con l'istomorfometria, e quindi viene utilizzato principalmente quale marca-

tore della formazione ossea. Il peptide è soggetto però ad una rapida degradazione, pertanto in circolo si ritrovano sia la forma intatta che frammenti di varie dimensioni. Infatti, la molecola intatta, costituita da 49 aminoacidi, è presente nel siero per circa il 36%, mentre enzimi proteolitici possono dare origine a diversi frammenti: un frammento N-terminale (1-19 aa), un frammento comprendente il tratto 20-43 aa, uno C-terminale (44-49 aa), uno N-terminale medio (1-43 aa) ed uno C-terminale medio (20-49 aa). E' stato visto, per esempio, che in soggetti con elevato *turnover* osseo si ritrovano in circolo alcuni frammenti molto piccoli N-terminali²².

I metodi disponibili in commercio per la determinazione dell'OC sono immunometrici con l'utilizzazione di anticorpi policlonali e monoclonali diretti verso epitopi diversi del marcatore. Numerosi lavori in letteratura hanno confrontato i risultati delle determinazioni di OC ottenuti con metodi diversi, dimostrando in vari esperimenti l'impossibilità di comparare i dati ottenuti^{23,24}. L'utilizzo di anticorpi monoclonali è stato visto ridurre la possibilità di crossreattività tra la forma carbossilata e la non carbossilata di circa il 5%. La eterogeneità dei frammenti di OC nel siero determina, pertanto, notevoli limitazioni all'utilizzo di tale marcatore nella pratica clinica, anche se i metodi che misurano sia la molecola intatta che il frammento 1-43 sembrano riflettere la reale sintesi di osteocalcina. Per il dosaggio dell'osteocalcina è importante considerare la tipologia del metodo (immunometrico, competitivo o non competitivo), la tipologia degli anticorpi (policlonali o monoclonali), la specificità degli anticorpi (molecola intatta o frammenti), la fonte dei calibratori (umana o bovina).

Ulteriori fonti di variabilità della determinazione sono soprattutto derivate dalla fase preanalitica. Il tipo di anticoagulante utilizzato, EDTA, può determinare alterazioni conformazionali della proteina con conseguente mascheramento degli epitopi antigenici e perdita della struttura secondaria rendendo la proteina più suscettibile alla proteolisi con conseguente frammentazione. Seibel indica il siero quale matrice preferibile per il dosaggio dell'osteocalcina²². In caso di campione lipemico, l'OC si può legare ai lipidi diventando non reattiva immunologicamente, con riduzione del valore dosato. Nel campione emolisato gli eritrociti liberano idrolasi in grado di degradare la proteina, dando valori falsamente bassi. E inoltre molto importante considerare l'instabilità *in vitro* dell'OC. Per la possibile degradazione in presenza di enzimi proteolitici nel campione, è necessario separare il siero o plasma dalla parte corpuscolata e conservare il campione a 4°C entro un'ora dal prelievo²⁵; in questo modo il campione è stabile per sette giorni oppure si può congelare fino al momento dell'analisi (-20°C stabile per un mese, a -70°C per periodi molto lunghi).

Rauchenzauner et coll. hanno visto che osteocalcina, BAP e CTx presentano una evidente correlazione con l'altezza, il peso ed l'indice di massa corporea, in bambini ed adolescenti, confermando l'accelerato *turnover* osseo durante la crescita e lo sviluppo²⁶.

La concentrazione ematica dell'osteocalcina è maggiore negli uomini fino a 49 anni rispetto alle donne, con una differenza statisticamente significativa fino a 44 anni. Nelle donne che assumono terapia contraccettiva Garnero e coll hanno trovato una riduzione dei valori dell'OC rispetto al

gruppo di controllo²⁷, mentre nelle donne in menopausa i livelli ematici dell'osteocalcina aumentano in maniera consistente. In particolare è stato visto che donne sane in menopausa da 1 anno presentano concentrazioni significativamente più alte della proteina rispetto a donne in premenopausa²⁸.

Peptidi terminali del Procollagene di tipo I

I peptidi terminali del Procollagene di tipo I sono i precursori derivanti dal collagene di tipo I. Nell'osso il collagene di tipo I è sintetizzato dagli osteoblasti in forma di procollagene. Sebbene i propeptidi del collagene di tipo I possano provenire da altri tessuti, quali i vasi sanguigni, i tendini, la cornea, la dentina e la cute il loro *turnover* è più lento di quello osseo, e pertanto contribuiscono molto poco al pool del pro peptide circolante²².

Dopo la sintesi intracellulare dei tre filamenti della molecola del pro collagene, il loro assemblaggio e la loro escrezione, due specifiche endopeptidasi agiscono sulle porzioni NH₂-terminale e COOH-terminale della molecola determinando la formazione di due peptidi: un peptide amino-terminale del Procollagene di tipo I (PINP) ed un peptide carbossi-terminale del Procollagene di tipo I (PICP). Entrambi i peptidi sono rilasciati in circolo in concentrazione equimolare durante la sintesi del collagene e possono essere considerati marcatori biochimici di formazione ossea²⁹. Sono entrambi catabolizzati a livello epatico ma il PICP viene eliminato dai recettori epatici per il mannosio, che sono modulati nella loro azione da fattori ormonali e fattori di crescita, mentre i recettori epatici *scavenger* deputati al catabolismo del PINP non risentono di fattori esterni. Per tale motivo il PINP riflette più accuratamente la formazione ossea.

La concentrazione sierica dei peptidi amino e carbossi-terminale del pro collagene di tipo I può essere determinata con metodi immunometrici. Alcuni studi hanno mostrato una buona correlazione fra i livelli sierici di PICP ed il tasso di formazione ossea³⁰. Tuttavia, mentre la rilevanza clinica del PICP nella valutazione delle malattie ossee è molto dibattuta, la concentrazione ematica del PINP appare essere di grande utilità diagnostica nel monitoraggio delle patologie ossee²².

MARCATORI DI RIASSORBIMENTO OSSEO

Cross-Links del collagene

Nel collagene vi sono due tipi di legame crociato (*cross-links*): i *cross-links* intramolecolari, tra due catene della stessa molecola e i *cross-links* intermolecolari tra catene attigue³¹⁻³³. A questo secondo gruppo appartengono legami riducibili, che diminuiscono di numero nel progredire del processo di maturazione del collagene, e legami non riducibili che invece aumentano nel corso dello stesso processo. Questi ultimi legami contribuiscono ad aumentare la resistenza meccanica delle fibre con il progredire dell'età. Tra i legami non riducibili due forme in particolare rivestono un ruolo nello studio del rimodellamento osseo: la piridinolina (idrossililpiridinolina; PYD), formata da tre residui di idrossililina, e la desossipiridinolina (lisilpiridinolina; DPD), formata da due residui di idrossililina e uno di lisina. Le due forme hanno diversa specificità tessu-

tale: la PYD è predominante nella cartilagine, ma si trova anche nell'osso, nei tendini e nel tessuto connettivo dei vasi sanguigni, la DPD si trova solo nel tessuto osseo e nella dentina. Ambedue le forme sono assenti nella pelle, e non sono influenzate dall'apporto dietetico di cibi contenenti collagene. I *cross-links* del piridinio vengono liberati in seguito alla degradazione delle fibrille di collagene maturo che avviene durante la fase di riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti. Essi passano nel circolo sanguigno e vengono successivamente eliminati dal rene. Nelle urine circa il 60% dei *cross-links* si trova in forma legata a peptidi di varie dimensioni e per il 40% in forma libera. La loro determinazione, soprattutto quella della DPD, è considerata marcatore di attività osteoclastica. Nel 1978 Fujimoto e coll. caratterizzarono la struttura dei *cross-links* del piridinio. Molti metodi sono stati sviluppati per la determinazione di questi marcatori di riassorbimento, principalmente nell'urina³⁴⁻³⁷. Mediante procedura cromatografica liquida ad elevate prestazioni (HPLC) è possibile determinare i due legami crociati piridinolina e desossipiridinolina contemporaneamente. I campioni di urina devono essere preventivamente sottoposti ad idrolisi acida prima della separazione cromatografica se si vuole ottenere la determinazione dei *cross-links* totali, questo passaggio è necessario al fine di liberare i legami crociati dai peptidi cui sono legati. Il dosaggio in HPLC, tuttavia, pur presentando caratteristiche di elevata specificità e sensibilità analitiche, risulta indaginoso e difficilmente applicabile in routine. La dimostrazione che misurando direttamente solo la quota libera di *cross-links*, evitando così l'idrolisi, si ottengono informazioni sullo stato del riassorbimento osseo simili a quelle ottenute con la misurazione dei *cross-links* totali ha portato allo sviluppo di metodi immunologici diretti per la misurazione della PYD e DPD libere o solamente della DPD libera. Sono oggi disponibili in commercio metodi immunometrici RIA, ELISA su piastra o chemiluminescenti implementati su strumenti automatici.

Telopeptidi amino e carbossi-terminale del collagene di tipo I

Lo sviluppo di anticorpi in grado di riconoscere alcune sequenze delle porzioni terminali non-elicoidali del collagene di tipo I ha permesso lo sviluppo di nuovi metodi analitici applicabili nello studio della fase del riassorbimento osseo³⁸⁻⁴³. Un anticorpo monoclonale riconosce una specifica sequenza aminoacidica (QYDGKGVG) della porzione amino-terminale del collagene I che contiene un'importante regione di *cross-links* intermolecolari. Questa sequenza, conosciuta come telopeptide amino-terminale del collagene di tipo I o NTX, è liberata in seguito all'attività idrolitica della catepsina K prodotta dagli osteoclasti. Una seconda sequenza peptidica è rappresentata da un octapeptide (EKAHDGGR) situato nella porzione carbossi-terminale delle catene alfa1 del collagene di tipo I. Questa porzione di molecola, denominata telopeptide carbossi-terminale del collagene di tipo I o CTX, contiene il 40% dei *cross-links* desossipiridinolinici. Questo octapeptide rappresenta il risultato di isomerizzazioni e racemizzazioni post-translazionali di tipo non enzimatico che avvengono a livello del residuo di acido aspartico contenuto nella sequenza. Quindi, in aggiunta alla forma nativa di tipo alfaL, presente nel collagene appena sintetizzato, esi-

stono potenzialmente tre isomeri presenti negli stadi di maturazione più avanzata: la forma isomerizzata contenente beta-aspartato (betaL), la forma racemizzata contenente il residuo D-aspartato (alfaD) e la forma isomerizzata/racemizzata betaD. Teoricamente, il rapporto tra la forma nativa alfaL ed ognuna delle altre tre forme potrebbe rappresentare un indice dell'età del tessuto osseo da cui sono rilasciate.

Entrambi i frammenti NTX e CTX, essendo di piccole dimensioni, vengono filtrati attraverso il glomerulo renale. Il loro dosaggio può essere effettuato sia su campioni di siero che di urina.

Un frammento più grande dei due precedentemente descritti è stato misurato nel siero. Si tratta di un frammento idrofobico, relativamente ricco in fenilalanina, sede di legami intermolecolari tra catene alfa1, situato sulla porzione carbossi-terminale del collagene di tipo I, conosciuto come ICTP e meglio definito dall'abbreviazione CTX-MMP. CTX-MMP e CTX, pur derivando dal frammento carbossi-terminale del collagene, sono rilasciati, durante la fase di riassorbimento, da differenti processi enzimatici. Infatti, l'azione della catepsina K, la maggior proteina prodotta dagli osteoclasti, porta alla formazione di CTX, mentre il CTX-MMP è prodotto dall'azione di diverse metalloproteinasi.

Metodi immunologici sono disponibili per la determinazione degli epitopi NTX e CTX sia su urina che su siero⁴⁴⁻⁵⁷. Alcuni metodi per la determinazione del CTX utilizzano anticorpi specifici per l'octapeptide contenente un residuo di acido aspartico beta-isomerizzato. La presenza del beta-isomero rende questo marcatore più specifico per il tessuto osseo, correlando soprattutto con l'età del tessuto stesso. I metodi di dosaggio del CTX su siero richiedono la presenza di una coppia di octapeptidi beta-D-isomerizzati, questo rende la determinazione su siero più specifica rispetto a quella su urina che richiede la presenza di un solo octapeptide.

Fosfatasi acida tartrato resistente

La fosfatasi acida (ACP; EC 3.1.3.2) è costituita da un gruppo di enzimi che idrolizzano gli esteri fosforici in ambiente acido⁵⁸. La ACP è un enzima ubiquitario e, nelle cellule, è localizzato prevalentemente nei lisosomi. Con l'impiego di L-(+)-tartrato è stata rilevata nel siero di soggetti sani la presenza di una frazione "tartrato-sensibile" e di una frazione "tartrato-resistente" (TRACP). La prima proviene dalla prostata, dai lisosomi di vari tessuti e dalle piastrine, la frazione "tartrato-resistente" proviene dagli osteoclasti, dalle cellule di Kupffer del fegato, dai macrofagi degli alveoli polmonari e della milza e dagli eritrociti. Tramite elettroforesi su gel di poliaccrilamide è possibile identificare cinque bande isoenzimatiche. La banda in posizione 5 è prevalentemente rappresentata dall'enzima prodotto dagli osteoclasti. La frazione 5 è a sua volta composta da una isoforma il cui pH ottimale di attività è 5, designata come TRACP 5a, e da una isoforma a pH ottimale 5.8, designata TRACP 5b. Studi sulla composizione biochimica della proteina 5a hanno dimostrato che questa contiene residui di acido sialico assenti nella forma 5b. Le caratteristiche chimico fisiche della TRACP purificata dagli osteoclasti corrispondono alle caratteristiche descritte per

la isoforma 5b, che quindi rappresenta in modo specifico l'enzima prodotto durante la fase di riassorbimento osseo, mentre l'origine della forma 5a rimane sconosciuta⁵⁹⁻⁶¹. La dimostrazione dell'esistenza nel siero di una isoforma denominata TRACP 5b, di specifica derivazione ossea, ha portato allo sviluppo di un metodo cinetico basato sull'utilizzo di inibitori più specifici e di un metodo immunologico basato sull'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico per questa isoforma⁶²⁻⁶³.

UTILIZZO CLINICO DEI MARCATORI BIOCHIMICI DI RIMODELLAMENTO OSSEO

La determinazione, nel sangue e nell'urina, dei prodotti biochimici derivati dall'attività delle cellule ossee fornisce informazioni importanti sull'attività metabolica del tessuto osseo. Negli ultimi venti anni la scoperta di nuove molecole di derivazione ossea e lo sviluppo di metodi analitici più sensibili e specifici ha notevolmente aumentato le capacità del Laboratorio di evidenziare alterazioni del metabolismo osseo. Un marcatore biochimico ideale deve possedere caratteristiche di elevata specificità tissutale, elevate sensibilità e specificità clinica, bassa variabilità biologica, stabilità, deve poter essere misurato con metodi analitici rapidi, semplici, automatizzati, sufficientemente precisi e accurati, deve indirizzare la scelta terapeutica ed influire positivamente sull'esito della patologia. A tutt'oggi non esiste il marcatore ideale che possieda tutte le caratteristiche sopra elencate, soprattutto un marcatore che possa essere utilizzato in fase diagnostica a causa della sovrapposizione dei valori derivati da soggetti sani e soggetti con patologia ossea, e di una intrinseca aspecificità nei confronti dell'eziologia dell'alterazione del metabolismo osseo. Queste molecole sono infatti espressione di un'alterazione dell'attività delle due linee cellulari ossee, osteoblasti e osteoclasti, riflettendo l'entità della formazione o del riassorbimento. La determinazione dei marcatori ossei può essere considerata più come una stima di un rischio che un marcatore specifico di malattia. Molte sono le patologie primitive o secondarie del tessuto osseo in cui sono state osservate aumentate concentrazioni di marcatori di formazione e di marcatori di riassorbimento e numerose sono le evidenze scientifiche che supportano l'utilizzo di questi marcatori nella gestione del paziente con patologie ossee⁶⁴⁻⁶⁹. La maggior parte dei dati presenti in letteratura riguarda l'utilizzo dei marcatori ossei nell'osteoporosi postmenopausale, condizione ad elevato impatto sociale sia per la diffusione nella popolazione generale che per l'importanza della sua più temibile conseguenza: la frattura⁷⁰⁻⁷⁴. Dai numerosi studi sono emerse evidenze che supportano l'utilizzo dei marcatori ossei al fine di predire la perdita ossea, predire il rischio di frattura e monitorare la terapia.

Predizione della perdita ossea

In molte situazioni cliniche è importante poter identificare i pazienti con elevata velocità di perdita ossea, condizione predisponente ad un'aumentata fragilità ossea ed ad un aumentato rischio di frattura. La condizione più comune in tal senso è sicuramente rappresentata dal periodo peri o post menopausale precoce nella donna. Le altera-

zioni tipiche dell'età involutiva, quando l'entità del riassorbimento osteoclastico prevale sulla neoformazione determinando una progressiva seppur lenta perdita di massa ossea, sono rese più evidenti nella donna a partire dalla menopausa a causa del venir meno dell'inibizione dell'attività osteoclastica esercitata dagli estrogeni. Nella carenza estrogenica si osserva, accanto al prevalere del riassorbimento sulla formazione a livello della singola unità di rimodellamento, un'aumentata frequenza di attivazione con un incremento del numero delle unità stesse. Tutto ciò può tradursi in due condizioni molto diverse in termini prognostici: una condizione di *slow losers* in cui la perdita di massa ossea è appunto lenta, ed una condizione di *fast losers* in cui la perdita di massa ossea può arrivare al 2% per anno nei primi tre anni di menopausa. Le donne categorizzate come *fast losers* potrebbero essere candidate alla terapia anti-riassorbitiva. Numerosi studi hanno supportato l'ipotesi che i valori dei marcatori ossei misurati in donne all'inizio della menopausa possono predire l'entità della perdita della massa ossea negli anni successivi, quindi essere di aiuto nella decisione di intraprendere o meno una terapia anti-riassorbitiva, e l'entità del recupero dopo la terapia stessa⁷⁵⁻⁸⁰.

Predizione del rischio di frattura

La misurazione della densità minerale ossea (BMD) con tecniche radiologiche o ad ultrasuoni dimostra un'elevata specificità nei confronti della valutazione del rischio di frattura ma una relativamente bassa sensibilità, ciò significa che numerosi soggetti che andranno incontro a frattura non possono essere identificati come soggetti ad alto rischio dalla sola determinazione della BMD. Ciò dipende dal fatto che il rischio di frattura è determinato non solo dalla massa ossea al momento della misurazione ma anche dalla perdita ossea a cui un soggetto andrà incontro nel tempo. Dati emergenti da numerosi studi prospettici hanno rilevato nei marcatori biochimici di rimodellamento osseo una forte potenzialità a predire il rischio di andare incontro a fratture⁸¹⁻⁸⁵. Il valore predittivo appare essere indipendente dai valori di massa ossea ottenuti con la densitometria, dall'età e dagli altri fattori di rischio di tipo clinico. In particolare, un aumento dei marcatori oltre i valori tipici dell'età premenopausale, considerati di riferimento, si associa ad un rischio doppio di andare incontro a frattura vertebrale e non vertebrale, in particolare di femore. L'integrazione dei molteplici fattori clinici per la stima del rischio di frattura è possibile grazie ad un algoritmo, conosciuto con l'acronimo FRAX, messo a punto nel 2008 da una commissione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. L'inclusione, in tale algoritmo, della determinazione dei marcatori biochimici porterebbe ad aumentarne la sensibilità clinica.

Monitoraggio della terapia

La densità minerale ossea (BMD) viene misurata attraverso tecniche radiografiche tra le quali la più usata è rappresentata dalla assorbimetria a raggi X a doppia energia (DEXA). La maggior parte dei farmaci anti-riassorbitivi utilizzati per la terapia dell'osteoporosi produce un aumento significativo della densità minerale ossea evidenziata con

la DEXA. Tuttavia, per valutare gli effetti della terapia anti-riassorbitiva con questa procedura è necessario che siano trascorsi almeno uno-due anni dall'inizio del trattamento stesso. Inoltre la BMD non fornisce alcuna informazione circa la velocità del rimodellamento osseo, informazione che può essere invece importante al fine della scelta del trattamento terapeutico più efficace per il singolo paziente. La misurazione della BMD può essere quindi integrata dalla determinazione dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo. L'indicazione più convalidata all'impiego dei marcatori ossei riguarda il loro utilizzo nella valutazione dell'efficacia degli effetti della terapia anti-riassorbitiva con bisfosfonati o con ormoni sostitutivi⁸⁶⁻¹⁰⁰. Una variazione significativa dell'efficacia del trattamento terapeutico può essere evidenziata con una determinazione dei marcatori ossei prima e dopo appena 3-6 mesi dall'inizio del trattamento, quindi molti mesi prima di una eventuale miglioramento della densità ossea osservata con la DEXA.

In aggiunta all'osteoporosi postmenopausale, i marcatori ossei possono essere utilizzati in altre patologie che coinvolgono il tessuto osseo. L'osteoporosi secondaria alla terapia cronica con steroidi è un problema clinico molto importante e diffuso.

I glucocorticoidi sono potenti agenti osteopenici. L'eccesso di glucocorticoidi, sia endogeni che iatrogeni, sbilancia il processo di rimodellamento inibendo selettivamente la proliferazione degli osteoblasti e potenziando gli effetti riassorbitivi del paratormone. Individuare i pazienti con elevato rischio di perdita ossea permette di associare alla terapia steroidea una terapia anti-riassorbitiva¹⁰¹⁻¹⁰⁵. Nel morbo celiaco, una patologia autoimmune caratterizzata da atrofia dei villi intestinali e conseguente malassorbimento, la presenza di una ridotta massa ossea è un fenomeno frequente¹⁰⁶⁻¹¹⁰. Il meccanismo che sottende la perdita di massa ossea nel morbo celiaco, anche se non completamente chiarito, viene ritenuto multifattoriale ed è stato attribuito sia ad un ridotto apporto ed assorbimento di calcio e di vitamina D, al sesso, a deficienza di magnesio ed oligoelementi, nonché ad una ridotta attività fisica ed ad effetti negativi delle citochine rilasciate dalla flogosi intestinale. In questi pazienti, si può valutare il grado di rimodellamento osseo mediante la determinazione, nel sangue e nell'urina, dei prodotti biochimici derivanti dall'attività delle cellule osteoclastiche ed osteoblastiche. Il morbo di Paget è caratterizzato da un aumentato rimodellamento osseo e conseguente dolore, fratture e deformità ossee. Anche in questa patologia i marcatori biochimici sia di riassorbimento che di formazione aumentano, soprattutto nelle forme poliostotiche che coinvolgono più segmenti ossei¹¹¹⁻¹¹³. La malattia porta ad una alterazione dell'osso anche in senso strutturale, rappresentata dalla sostituzione di normale osso lamellare con tessuto in cui le fibre di collagene sono distribuite in modo estremamente irregolare in cui il grado di beta-isomerizzazione del telopeptide carbossiterminale è rallentato. In questi pazienti è stato possibile dimostrare che il rapporto tra la forma nativa di tipo alfaL, presente nel collagene appena sintetizzato, e la forma beta, caratteristica dell'osso maturo, è aumentato e diminuisce in seguito alla terapia con bisfosfonati.

Il mieloma multiplo è caratterizzato dalla distruzione

di tessuto osseo conseguente all'attivazione degli osteoclasti da parte delle cellule mielomatose, a cui non corrisponde un'appropriata attivazione della formazione ossea essendo gli osteoblasti ridotti sia in termini numerici che di attività. In questa patologia i marcatori biochimici di formazione ossea sono quindi spesso diminuiti, mentre i marcatori di riassorbimento sono aumentati¹¹⁴⁻¹¹⁸.

Nelle patologie tumorali la presenza di metastasi ossee altera profondamente il rimodellamento osseo. I marcatori biochimici possono essere utilizzati nella diagnosi delle metastasi, nel monitoraggio della terapia e nella valutazione prognostica¹²⁰⁻¹²². Principalmente i marcatori di riassorbimento rispondono alla terapia anti-riassorbitiva con bisfosfonati ed alla terapia antineoplastica e questa risposta sembra essere associata ad una prognosi più favorevole.

ASPETTI INTERPRETATIVI, FONTI DI VARIABILITA' DEI RISULTATI

L'interpretazione dei risultati di laboratorio deve considerare le potenziali fonti di variabilità di un dato. Anche nel caso dei marcatori biochimici del rimodellamento osseo, la variabilità associata ai risultati delle determinazioni può compromettere il loro utilizzo clinico. Fonti di variabilità possono derivare dalla fase preanalitica e analitica o dalla biologia stessa del singolo marcatore. Conoscere e controllare i fattori che contribuiscono a tale variazione è cruciale per un'interpretazione corretta dei risultati. La variabilità preanalitica viene condizionata dalle condizioni di preparazione del paziente (postura, esercizio fisico, digiuno, etc.), dalle modalità di raccolta e trattamento del campione biologico (anticoagulanti, acidificanti, etc.), dalle modalità di conservazione del campione biologico (temperatura, esposizione alla luce), dalla presenza di emolisi¹²³⁻¹²⁸.

Condizioni preanalitiche che provocano alterazioni importanti nei risultati sono per esempio l'utilizzo di sieri emolisi o lipemici per la determinazione dell'osteocalcina, o, per la determinazione dei *cross-links* del piridinio, la determinazione su campioni di urina esposti alla luce ultravioletta, ottenendo, nel primo caso, valori falsamente elevati e nel secondo caso risultati falsamente diminuiti.

Nell'ambito dei marcatori biochimici di rimodellamento osseo, la variabilità analitica rappresenta ancor oggi un problema irrisolto. In molti casi (fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina, *cross-links* del piridinio) esistono in commercio metodi diversi per la determinazione dello stesso analita. Per il dosaggio della fosfatasi alcalina ossea sono fonti di variabilità analitica la diversa immunoreattività delle isoforme, la potenziale reattività crociata con la ALP epatica nei metodi immunoassistiti, la possibilità di coprecipitazione della forma biliare e della forma epatica, nel metodo di precipitazione con lectina. Per l'osteocalcina bisogna considerare la tipologia del metodo immunochimico (competitivo o non competitivo), la tipologia degli anticorpi (policlonali o monoclonali), la specificità degli anticorpi (molecola intatta o frammenti), la fonte dei calibratori (bovina o umana); per i *cross-links* del piridinio la specificità degli anticorpi verso la PYD o la DPD, l'idrolisi del campione prima della determinazione per dosare tutte le molecole, libere e legate.

I vari metodi utilizzano standard per la calibrazione di diversa provenienza, gli anticorpi utilizzati nei metodi immunochimici rilevano molecole antigenicamente diverse, tutto ciò porta ad una estrema variabilità dei risultati ottenuti da laboratori diversi per lo stesso marcatore e questo oltre a rendere difficile la comparazione dei dati sui singoli pazienti, rende impossibile paragonare i risultati ottenuti dai molti studi presenti in letteratura sull'utilizzo dei marcatori biochimici nelle diverse patologie ossee. Da qui la necessità di implementare rigorose strategie di standardizzazione delle varie metodiche e di rendere disponibili ai laboratori programmi di valutazione esterna della qualità rivolti specificatamente a controllare l'accuratezza e l'imprecisione.

Ulteriore fonte di variabilità dei risultati deriva dalla variabilità biologica¹²⁹⁻¹³⁴. In termini generali si definisce variabilità biologica quella variabilità di tutti i parametri biologici originata da meccanismi omeostatici che provocano fluttuazioni fisiologiche all'interno di ogni individuo (CV_I), e tra gli individui (CV_G). La variabilità biologica è quantificabile ma non può essere ridotta ne tantomeno annullata. La conoscenza di quanto questo tipo di variabilità possa influire sul risultato della determinazione di un analita ha molta importanza per l'interpretazione del risultato stesso. Gli obiettivi analitici, la differenza critica (DC), ovvero la differenza in percentuale necessaria affinché due determinazioni consecutive nello stesso individuo possano essere considerate significativamente diverse tra loro, l'indice di individualità (II) dato dal rapporto tra CV_I e CV_G , rappresentante la stima dell'individualità della variazione biologica, che fornisce indicazioni sull'utilità o meno dell'uso dei tradizionali limiti di riferimento, la definizione del campione biologico ottimale sono tutte informazioni fondamentali derivabili in maniera oggettiva unicamente attraverso la sua conoscenza. La tabella 3 mostra i dati relativi alla variabilità biologica, ed agli indici da essa derivati, calcolata per i principali marcatori sierici ed urinari. I dati sulla variabilità biologica consentono di rispondere oggettivamente a molti quesiti, permettendo di orientarsi, a parità di caratteristiche fisiopatologiche, verso il marcatore che associa migliore praticità e più

Tabella 3
Variabilità Biologica

	CV _I , %	CV _G , %	CD, %
Marcatori di formazione ossea			
S-Fosfatasi alcalina ossea	6.6	35.6	20
S-Osteocalcina	9.1	30.9	29
Marcatori di riassorbimento osseo			
S-TRACP	10.8	13.3	35
S-β CTX	16.7	40.3	51
U-β CTX	24.5	30.9	70
U-NTx	14.7	26.9	44
U-DPD totale	23.5	26.0	70
U-DPD libera	13.1	26.0	40
U-PYD libera	18.6	24.8	57

S= siero; U=urina

bassa variabilità. Tutti i marcatori ossei considerati, sia sierici che urinari, possiedono un'elevata variabilità biologica, tale situazione non consente l'impiego di un marcatore biochimico nello screening, mentre consente di monitorare eventuali variazioni nel singolo individuo, soprattutto in corso di trattamento farmacologico applicando per la valutazione dell'andamento dei risultati la DC. Molti studi hanno dimostrato l'esistenza di un marcato ritmo circadiano, con importanti variazioni nell'arco della giornata della concentrazione sia dei marcatori determinati su siero che di quelli determinati su campioni di urina. Questo fenomeno rende fondamentale valutare attentamente il tempo a cui viene raccolto il campione biologico per la determinazione, ponendo particolare attenzione affinché nel paziente in monitoraggio prelievi in tempi successivi vengano sempre effettuati nello stesso momento del giorno.

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo offrono molti vantaggi nella pratica clinica. Non prevedono procedure invasive sul paziente, in quanto sono determinati su campioni biologici facilmente reperibili, possono essere ripetuti più volte nel tempo, le loro variazioni sono rilevabili in tempi brevi, a permettere un tempestivo intervento quale la sospensione di un farmaco o meglio ad incoraggiare il paziente nel proseguimento della terapia. Tuttavia, per un loro corretto utilizzo, vanno attentamente considerate tutte le possibili cause di variabilità dei risultati. E' inoltre necessario implementare rigorose strategie di standardizzazione, programmi di valutazione esterna della qualità dei metodi analitici e definire intervalli di riferimento specifici per sesso ed età¹³⁵⁻¹³⁹. Molte delle attuali conoscenze sull'applicazione clinica di questi marcatori vengono da studi clinici sulla terapia dell'osteoporosi il cui obiettivo principale è rappresentato dagli effetti della terapia stessa sulla densità minerale ossea. Sono necessari, per una più larga diffusione nella pratica clinica, studi che valutino la relazione diretta tra le concentrazioni dei marcatori biochimici e l'incidenza di frattura che rappresenta senza dubbio la conseguenza più temibile delle alterazioni del rimodellamento osseo. Utilizzati insieme alla valutazione clinica del paziente e alle tecniche d'immagine, i marcatori biochimici di rimodellamento osseo rivestono comunque un ruolo importante nella valutazione delle patologie metaboliche del tessuto osseo e, se applicati ed interpretati correttamente, rappresentano un'importante strumento sia nella fase diagnostica che nella fase terapeutica della gestione del singolo paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al.** Bone biology. Part I. Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996;45:371-86
2. **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al.** Bone biology. Part II. Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 1996;45:387-99
3. **Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD.** The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17:319-36
4. **Raisz LG.** Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45:1353-8
5. **Baron R, Neff L, Tran Van P, et al.** Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986;122:363-78
6. **Pacifici R, Carano A, Santoro SA, et al.** Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1991;87:221-8
7. **Martin TJ, Romas E, Gillespie MT.** Interleukins in the control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:107-23
8. **Munoz-Torres M, de la Higuera Lopez-Frias M, Fernandez Garcia D.** Advances in osteoclast biology: the osteoprotegerin-RANK ligand system. *Med Clin* 2004;122:75-7
9. **Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, et al.** Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989;245:855-7
10. **Siddhanti SR, Quarles LD.** Molecular and pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1994;55:310-20
11. **Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, et al.** Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 1998;101:1942-50
12. **Khosla S, Melton LJ, Atkinson EJ, et al.** Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2266-74
13. **Michael K, Harkonen PL, Vaananen HK, et al.** Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Mineral Res* 2005;20:2224-32
14. **de Vernejoul MC.** Dynamics of bone remodelling: biochemical and pathophysiological basis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:729-34
15. **Manolagas SC.** The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:194-204
16. **Harris H.** The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1990; 186:133-50
17. **Langlois MR, Delonghe JR, Kaufman JM, et al.** Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic bone disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32:675-80
18. **Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, et al.** Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterisation and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999;14:1926-33
19. **Cavaliere E, Rozet E, Carlisi A, et al.** Analytical validation of serum bone alkaline phosphatase (BAP OSTASE) on Liaison. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:67-72
20. **Lee NK, Karsenty G.** Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:161-6
21. **Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G.** A paradigm

- of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2009;310:21-9
22. **Seibel MJ.** Biochemical markers of bone turnover. Part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26:97-122
 23. **Lee AJ, Hodges S, Eastell R.** Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432-46.
 24. **Hosada K, Eguchi H, Nakamoto T, et al.** Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin Chem* 1992;38:2233-8
 25. **Stokes FJ, Ivanov P, Bailey LM, et al.** The effects of sampling procedures and storage conditions on short-term stability of blood-based biochemical markers of bone metabolism. *Clin Chem* 2011;57:138-40
 26. **Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, et al.** Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:443-9
 27. **Garnero P, Sornay-Rendu E, Delmas PD.** Decreased bone turnover in oral contraceptive users. *Bone*. 1995;16:499-503
 28. **Yasui T, Uemura H, Tomita J, et al.** Association of serum undercarboxylated osteocalcin with serum estradiol in pre-, peri- and early post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2006;29:913-8
 29. **Eriksen EF, Charles P, Melsen F, et al.** Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-32
 30. **Hassager C, Jensen LT, Johansen JS, et al.** The carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in serum as a marker of bone formation: the effect of nandrolone decanoate and female sex hormones. *Metabolism* 1991;40:205-8
 31. **Fujimoto D, Moriguchi T, Ishida T et al.** The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:52-7
 32. **Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP.** Urinary pyridinium crosslinks of collagen: specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol Metab* 1992;3:263-70
 33. **Knott L, Bailey AJ.** Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998;22:181-7
 34. **Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, et al.** Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1993;8:635-41
 35. **Robins SP, Woitge H, Hesley R, et al.** Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* 1994;9:1643-9
 36. **Gomez B, Ardakani S, Evans, et al.** Monoclonal antibody assay for free urinary pyridinium crosslinks. *Clin Chem* 1996;42:1168-75
 37. **Robins SP, Duncan A, Wilson N, et al.** Standardization of pyridinium crosslinks, pyridinoline and deoxypyridinoline, for use as biochemical markers of collagen degradation. *Clin Chem* 1996;42:1621-6
 38. **Apone S, Lee MY, Eyre DR.** Osteoclasts generate cross-linked collagen N-telopeptide (NTx) but no free pyridinolines when cultured on human bone. *Bone* 1997;21:129-36
 39. **Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PAC et al.** Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alfa1) region. *J Biol Chem* 1997;272:9755-63.
 40. **Brady JD, Ju J, Robins SP.** Isoaspartyl bond formation within n-terminal sequences of collagen type I: implications for their use as markers of collagen degradation. *Clin Sci* 1999;96:209-15
 41. **Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, et al.** Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generated by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone* 2000;26:241-7
 42. **Cloos PAC, Fledelius C.** Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem J* 2000;345:473-80
 43. **Gineyts E, Cloos PAC, Borel O, et al.** Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover. *Biochem J* 2000;345: 481-5
 44. **Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, et al.** A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992;7:1251-8
 45. **Risteli J, Elomaa I, Niemi S, et al.** Radioimmunoassay for the pyridinoline crosslinked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993;39:635-40
 46. **Bonde M, Qvist P, Fledelius C, et al.** Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994;40:2022-5
 47. **Garnero P, Gineyts E, Riou JP, Delmas PD.** Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:780-5
 48. **Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, et al.** Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin Chem* 1997;43:2058-63
 49. **Bonde M, Garnero P, Fledelius C, et al.** Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res* 1997;12:1028-34
 50. **Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, et al.** Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of

- type I collagen. *Clin Chem* 1998;44:2281-9
51. **Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, et al.** Clinical evaluation of the serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 1998;44:2290-300
 52. **Traba ML, Calero HA, Mendez-Davila C, et al.** Different behaviors of serum and urinary CrossLaps ELISA in the assessment of bone resorption in healthy girls. *Clin Chem* 1999;45:682-3
 53. **Pagani F, Bonetti G, Stefini F, et al.** Evaluation of a fully automated assay to measure C-telopeptide of type I collagen in serum. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1111-3
 54. **Garnero P, Borel O, Delmas PD.** Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001;47:694-702
 55. **Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M, et al.** Clinical evaluation of the Elecsys β -CrossLaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C-telopeptide. *Clin Chem* 2001;47:1410-4
 56. **Chubb SA.** Measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in serum. *Clin Biochem* 2012;45:928-35
 57. **Herrmann M, Seibel MJ.** The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;393:57-75
 58. **Bull H, Murray PG, Thomas D, et al.** Acid phosphatases. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2002;55:65-72
 59. **Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT.** Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 2001;47:74-80
 60. **Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, et al.** Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 2001;47:597-600
 61. **Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, et al.** Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 2006;52:499-509
 62. **Price CP, Kirwan A, Vader C.** Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption (Editorial). *Clin Chem* 1995;41:641-3
 63. **Nakanishi M, Yoh K, Miura T, et al.** Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 2000, 46: 469-73
Cheung CK, Panesar SR, Haines C, et al. Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. *Clin Chem* 1995;41:679-86
 64. **Christenson RH.** Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997;30:573-93
 65. **Demers LM.** Clinical usefulness of markers of bone degradation and formation. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:12-20
 66. **Blumsohn A, Eastell R.** The performance and utility of biochemical markers of bone turnover: do we know enough to use them in clinical practice? *Ann Clin Biochem* 1997;34:449-59
 67. **Watts N.** Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clin Chem* 1999;45:1359-68
 68. **Looker AC, Bauer DC, Chesnut CH III, et al.** Clinical use of biochemical markers of bone remodelling: current status and future directions. *Osteoporos Int* 2000;11:467-80
 69. **Seibel MJ.** Biochemical markers of bone turnover. Part II: clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006;27:123-38
 70. **Garnero P.** Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7:84-90
 71. **Brown JP, Albert C, Nassar BA, et al.** Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2009;42:929-42
 72. **Vasikaran SD, Cooper C, Kanis JA.** Recommendations for bone marker standards in osteoporosis: what, why and where to now? *Ann Clin Biochem* 2011;48:91-2
 73. **Naylor K, Eastell R.** Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:379-89
 74. **Lee J, Vasikaran S.** Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012;32:105-12
 75. **Rosen CJ, Chestnut CH III, Mallinak NJS.** The predictive value of biochemical markers of bone turnover for bone mineral density in early postmenopausal women treated with hormone replacement or calcium supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1904-10
 76. **Ross PD, Knowlton W.** Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *J Bone Miner Res* 1998;13:297-302
 77. **Ravn P, Clemmensen B, Christiansen C.** Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Bone* 1999;24:237-44
 78. **Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, et al.** Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the Ofely Study. *J Bone Miner Res* 1999;14:1614-21
 79. **Bauer DC, Sklarin PM, Stone KL, et al.** Biochemical markers of bone turnover and prediction of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fracture. *J Bone Miner Res* 1999;14:1404-10
 80. **Rogers A, Hannon RA, Eastell R.** Biochemical markers as predictors of rates of bone loss after menopause. *J Bone Miner Res* 2000;15:1398-404
 81. **Garnero P, Hausher E, Chapuy MC, et al.** Markers of bone resorption predicts fractures in elderly women: the EPIDOS prospective study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1531-8
 82. **Chapurlat RD, Garnero P, Breart G, et al.** Serum type I collagen breakdown products (serum CTX) predicts hip fracture risk in elderly women: the EPIDOS study. *Bone* 2000;27:283-6

83. **Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, et al.** Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY Study. *J Bone Miner Res* 2000;15:1526-36
84. **Ross PD, Kress BC, Parson RE, et al.** Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporos Int* 2000;11:76-82
85. **Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, et al.** Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: the OFELY Prospective Study. *J Bone Miner Res* 2002;17:826-33
86. **Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, et al.** Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1693-700
87. **Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al.** Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1998;63:363-8
88. **Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al.** Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effects more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 2000;66:100-3
89. **Hamwi A, Ganem AH, Grebe C, et al.** Markers of bone turnover in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:414-7
90. **Chailurkit L, Ongphiphadhanakul B, Piaseu N, et al.** Biochemical markers of bone turnover and response of bone mineral density to intervention in early postmenopausal women: an experience in a clinical laboratory. *Clin Chem* 2001;47:1083-8
91. **Johnell O, Scheele WH, Lu Y, et al.** Additive effects of raloxifene and alendronate on bone density and biochemical markers of bone remodelling in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:985-92
92. **Weinstein RS, Parfitt AM, Marcus R, et al.** Effects of raloxifene, hormone replacement therapy, and placebo on bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2003;14:814-22
93. **Worsfold M, Powell DE, Jones TJW, et al.** Assessment of urinary bone markers for monitoring treatment of osteoporosis. *Clin Chem* 2004;50:2263-70
94. **Kleerekoper M, Camacho P.** Monitoring osteoporosis therapy [Editorial]. *Clin Chem* 2005;51:2227-8
95. **Valimaki MJ, Tahtela R.** Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5B or amino-terminal propeptide of type I procollagen for monitoring bisphosphonate therapy in postmenopausal women? *Clin Chem* 2005;51:2382-5
96. **Chen P, Satterwhite JH, Licata AA, et al.** Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2005;20:962-70
97. **Roux C, Garnero P, Thomas T, et al.** Comité Scientifique du GRIIO. Recommendations for monitoring antiresorptive therapies in postmenopausal women. *Joint Bone Spine* 2005;72:26-31
98. **Bonnick SL, Shulman L.** Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med* 2006;119:25S-31S
99. **Bergmann P, Body JJ, Boonen S, et al.** 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
100. **Silva-Fernandez L, Rosario MP, Martinez-Lopez JA, et al.** Denosumab for the treatment of osteoporosis: a systematic literature review. *Reumatol Clin* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma>. (ultimo accesso: 07.06.2012)
101. **Meeran K, Hattersley A, Burrin J, et al.** Oral and inhaled corticosteroids reduce bone formation as shown by plasma osteocalcin levels. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:333-6
102. **Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al.** Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998;102:274-82
103. **Paglia F, Dionisi S, De Geronimo S, et al.** Biomarkers of bone turnover after a short period of steroid therapy in elderly men. *Clin Chem* 2001;47:1314-6
104. **Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F.** Molecular mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2001;29:498-505
105. **Ton FN, Gunawardene SC, Lee H, et al.** Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J Bone Mineral Res* 2005;20:464-70
106. **Keaveny AP, Freaney R, McKenna MJ, et al.** Bone remodeling indices and secondary hyperparathyroidism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1226-31
107. **Kempainen T, Kroger H, Janatuinen E, et al.** Osteoporosis in adult patient with celiac disease. *Bone* 1999;24:249-55
108. **Selby PL, Davies M, Adams JE, et al.** Bone loss in celiac disease is related to secondary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 1999;14:652-7
109. **Southerland JC, Valentine JF.** Osteopenia and osteoporosis in gastrointestinal diseases: diagnosis and treatment. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:399-407
110. **Taranta A, Fortunati D, Longo M, et al.** Imbalance of osteoclastogenesis-regulating factors in patients with celiac disease. *J Bone Miner Res* 2004;19:1112-21
111. **Randall AG, Kent GN, Garcia-Webb P, et al.** Comparison of biochemical markers of bone turnover in Paget disease treated with pamidronate and a proposed model for the relationships between measurements of the different forms of pyridinoline cross-links. *J Bone Miner Res* 1996;11:1176-84

I marcatori biochimici di rimodellamento osseo: utilizzo nella pratica clinica

112. **Garnero P, Fledelius C, Gineyts E, et al.** Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type I collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1997;12:1407-15
113. **Woitge HW, Oberwittler H, Heichel S, et al.** Short- and long-term effect of ibandronate treatment on bone turnover in Paget disease of bone. *Clin Chem* 2000;46:684-90
114. **Nawawi H, Samson D, Apperley J, et al.** Biochemical bone markers in patients with multiple myeloma. *Clin Chim Acta* 1996;253:61-77
115. **Pecherstorfer M, Horn E, Woitge HW, et al.** Bone resorption in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy of undetermined significance: quantification by urinary pyridinium cross-links of collagen. *Blood* 1997;90:3743-50
116. **Withold W, Arming M, Schwarz M, et al.** Monitoring of multiple myeloma patients by simultaneously measuring marker substances of bone resorption and formation. *Clin Chim Acta* 1998;269:21-30
117. **Woitge HW, Horn E, Keck AV, et al.** Biochemical markers of bone formation in patients with plasma cell dyscrasias and benign osteoporosis. *Clin Chem* 2001;47:686-93
118. **Heider U, Fleissner C, Zavrski I, et al.** Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42:1544-53
119. **Demers LM, Costa L, Chinchilli VM, et al.** Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin Chem* 1995;41:1489-94
120. **Berruti A, Dogliotti L, Gorzegno R, et al.** Differential patterns of bone turnover in relation to bone pain and disease extent in bone in cancer patients with skeletal metastases. *Clin Chem* 1999;45:1240-7
121. **Fohr B, Dunstan CR, Seibel MJ.** Markers of bone remodelling in metastatic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5059-75
122. **Seibel MJ.** Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:504-17
123. **Gerrits MI, Thijssen JHH, van Rijn HJM.** Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin Chem* 1995;41:571-4
124. **Blumsohn A, Colwell A, Naylor K, et al.** Effects of light and γ -irradiation on pyridinoline and telopeptides of type I collagen in urine. *Clin Chem* 1995;41:1195-7
125. **Herrmann M, Pape G, Herrmann W.** Stability of serum β -Crosslaps during storage: influence of pH and storage temperature. *Clin Chem* 2001;47:939-40
126. **Herrmann M, Pape G, Herrmann W.** Measurement of serum β -Crosslaps is influenced by proteolytic conditions. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:790-4
127. **Vesper HW, Demers LM, Eastell R, et al.** Assessment and recommendations on factors contributing to preanalytical variability of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *Clin Chem* 2002;48:220-35
128. **Zwart SR, Wolf M, Rogers A, et al.** Stability of analytes related to clinical chemistry and bone metabolism in blood specimens after delayed processing. *Clin Biochem* 2009;42:907-10
129. **Panteghini M, Pagani F.** Biological variation in bone-derived biochemical markers in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:609-16
130. **Panteghini M, Pagani F.** Biological variation in urinary excretion of pyridinium crosslinks: recommendations for the optimum specimen. *Ann Clin Biochem* 1996;33:36-42
131. **Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, et al.** Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 1998;13:1124-33
132. **Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M, et al.** Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:736-9
133. **Pagani F, Panteghini M.** Diurnal rhythm in urinary excretion of pyridinium crosslinks. *Clin Chem* 1994;40:952-3
134. **Wilchers M, Schmidt E, Bidlingmaier F, et al.** Diurnal rhythm of CrossLaps in human serum. *Clin Chem* 1999;45:1858-60
135. **Seibel MJ, Lang M, Geilenkeuser WJ.** Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem* 2001;47:1443-50
136. **Vesper HW, Smith SJ, Audain C, et al.** Comparison study of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline measurements in 13 US laboratories. *Clin Chem* 2001;47:2029-31
137. **Bernardi D, Zaninotto M, Plebani M.** Requirements for improving quality in the measurement of bone markers. *Clin Chim Acta* 2004;346:79-86
138. **Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, et al.** Establishing a reference interval for bone turnover markers in 637 healthy, young, premenopausal women from the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *J Bone Miner Res* 2009;24:389-97
139. **Vasikaran SD, Morris HA, Cooper C, Kanis JA.** Standardising biochemical assessment of bone turnover in osteoporosis. *Clin Biochem* 2011;44:1033-4

Per corrispondenza:

Dott.ssa Franca Pagani
Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Fondazione Poliambulanza Istituto Ospedaliero
Via Bissolati, 57, 25124 Brescia
Tel.: 030 3515062
e-mail: franca.pagani@poliambulanza.it