

Yeni Kemik Markırları ve Klinik Kullanımları

NEW BONE MARKERS AND CLINICAL UTILITY

Taner ÖZGÜRТАŞ*, Türker KUTLUAY**

* Yrd.Doç.Dr., GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD,

** Prof.Dr., GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, ANKARA

Özet

Kemik, çok sayıda madde ve faktörün katıldığı yapım ve yıkım işlemlerinin birbirini takip ettiği dinamik ve karmaşık bir dokudur. Kemiğin bu aktif siklusunu yakından izleyebilmek için, yapım ve yıkım sırasında ortaya çıkan birtakım protein ürünleri ve enzim ölçümlerinden faydalanılır ve bunların tümüne kemiğin biyokimyasal markırları denir. Geçmişin sıkça kullanılan yapım için alkalen fosfataz, yıkım için idrar hidroksiprolin ölçümleri, yerlerini daha özgün ve daha duyarlı yeni markırlara bırakmaktadır. Yeni markırlar sayesinde osteoporoz, metabolik kemik hastalıkları ve metastatik kemik kanserlerinin izlenmesi eskiye oranla çok daha kolaylaşmıştır. Biyokimyasal markırların her birinin farklı bir biyokimyasal ve fizyolojik döngüsü olduğu ve bu nedenle kemikle ilgili olaylarda her zaman aynı değişiklikleri göstermeyecekleri de akıldan çıkarılmamalıdır. Ancak teknolojik gelişmeler ve yeni markırların katılımıyla, kemik dokusuna ait daha kesin bilgilere ulaşılabilecektir. Bu yazıda, kemik turnover'unda rol alan kemik markırlarının klinik kullanımlarından ve yeni markırların özelliklerinden bahsedilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kemik yıkımı, Kemik yapımı, Markır

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:523-527

Summary

Bone tissue is such a dynamic and complex tissue that formation and resorption events are cycling consecutively each other where numerous elements and factors are involved. To monitor this active turnover of bone tissue effectively, measurements of some protein products and enzymes formed and released during this turnover so called biochemical markers can be performed. Alkaline phosphatase and urine hydroxyproline measurements, which have been used for many years for formation and resorption, respectively, are replaced with new more specific and sensitive markers. These new markers have become more available to follow-up osteoporosis, metabolic bone diseases and metastatic bone cancers. It is important to remember that individual markers reflect different biochemical and physiological processes and may not, therefore, always show identical changes. However, with technological improvements and the introduction of new markers it is certain to reach more detailed information about bone events. This study describes the characteristics of new markers and clinical applications of bone markers functioning in bone turnover.

Key Words: Bone resorption, Bone formation, Marker

T Klin J Med Sci 2001, 21:523-527

Kemik markırlarının klinik kullanımları

Kemik turnover'ını (yıkım-yapım) doğru olarak tanımlayacak spesifik markırların bulunmasıyla, metabolik kemik hastalıklarının farklı formları daha kolay ayırt edilebilmektedir (1). Bu markırların birçoğuyla kemiğin yeniden düzenlenmesini (remodeling) takip etmek eskisinden çok daha kolay ve radyolojik tetkiklere göre çok daha önce olabilmektedir (2). Günümüzde metabolik kemik hastalıklarının ayırıcı tanısında kesin bir yöntem olarak kabul edilen kemik mineral yoğunluğu (Bone Mineral Density-BMD) ve dokunun durumunu en iyi yansıtan doku biyopsileri büyük ölçüde rağbet görmektedir. Biyokimyasal

Geliş Tarihi: 26.02.2001

Yazışma Adresi: Dr. Taner ÖZGÜRТАŞ
GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD
Etlik, ANKARA

T Klin J Med Sci 2001, 21

yeni markırların üstünlükleri ise, kemik dokusundaki çok küçük değişiklikleri en gelişmiş radyolojik tekniklerden ve diğer testlerden çok daha önce ortaya çıkarabilmesidir. Bu aşamada kemik markırlarının klinik kullanımları 3 ana başlık altında toplanabilir (Tablo 1) (3).

1- Kemik kaybının tahmini

Günümüzde sağlık koşullarının iyileşmesi ve refah düzeyinin yükselmesi yaşlı popülasyonda belirgin bir artışa neden olmuştur. Özellikle yaşlılarda, metabolik kemik hastalığı majör problemler arasında yer almaktadır. Sadece Amerika'da yaklaşık 25 milyon kişi metabolik kemik hastalığının en yaygın formu olan osteoporozdan etkilenmektedir (3,4). Osteoporozla ilgili kemik dokusunda önemli ölçüde kayıpların olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklerin kesin olarak tespiti, olay başladıktan en az bir yıl sonra BMD ile yapılabilirken, yeni kemik markırları ile erken menopozun ilk birkaç haftasında başarılabilir. Kemik

Tablo 1. Kemik markırlarının klinik kullanımları

1-Kemik kaybının tahmini
Menopoza bağlı kemik kaybı
Senil osteoporozda kemik kaybı
Tiroid veya glukokortikoid ilaç alanlarda
Gn-RH agonisti kullananlarda kemik kaybı
Hiperparatiroidili hastalarda kemik kaybı
Growth hormon tedavisi alanlarda
Adölesan kemik gelişiminin takibinde
2-Metabolik kemik hastalığında ilaç seçimi ve doz-cevap ilişkisinin
irdelenmesinde
3-Metastatik kemik tümörlerinde teşhis ve takip amaçlı

yıkımı (rezorpsiyonu) hakkında bilgi edinmek, olası kemik kırıklarını önceden tahmin etmemizi de kolaylaştırabilir (5-7).

Kemik markırları, kısa veya uzun dönem tedavi gerektiren endokrin hastalıklar açısından da önemlidir. Hipertiroidizmde, tiroid hormonlarının osteoklastlar üzerinden kemik yıkımını hızlandırıcı etkisinin ne ölçüde olacağı ve kemik kaybının büyüklüğü markırlar ile tayin edilebilir (8,9).

Hiperparatiroidizmde, Parat hormonun (PTH) direk kemik yıkımı etkisiyle oluşan kemik kayıplarının tayininde ve takibinde yine kemik markırları kullanılabilir.

Cushing gibi aşırı glukokortikoid hormon salınımı ile seyreden hastalıklarda, kortizol'ün osteoblastlar üstündeki inhibitör, osteoklastlar üzerindeki PTH'a duyarlılığı artırıcı etkisi doğal olarak kemik dokusunda kayba neden olur. Bu tip vakalarda da kemik markırları faydalı olabilir (10,11).

Bazı gonadal hastalıklarda (endometriozis, benign prostat hipertrofisi vb), gonadotropin releasing hormon (Gn-RH) agonistlerinin kullanımı ile seks hormonlarının inhibisyonu kemik kaybına zemin hazırlar, bu vakalarda da kemik markırları takip amaçlı kullanılabilir (12).

Ayrıca kemik markırları, ergenlik dönemdeki uygun kemik gelişiminin takibinde de kullanılabilir. Bilindiği gibi, ergenlik dönemdeki yetersiz kemik gelişimi sonraki dönemlerde prematüre osteoporozu neden olabilir (13).

2- Metabolik kemik hastalıklarında ilaç seçimi ve doz-cevap ilişkisinin yorumlanması

Kemik markırları klinikte, osteoporoz veya metabolik kemik hastalıklarında kullanılan anti-rezorptif (bifosfonatlar, hormon tedavisi, florid, kalsitonin gibi) ilaçların kemik üstündeki etkisini gözlemek amacıyla da kullanılabilir (5,14). Markırlarla takip, kemik kaybına ilişkin bilgilere tedavinin ilk birkaç haftasında ulaşmamızı sağlayabilir. Bu sayede tedavide ilaç seçimi ve doz değiştirme gibi konular kısa sürede sonuca bağlanabilir. Hatta birçok klinik, kemik markırlarının erken ve geç menopozal dönemlerdeki değerlerini, pratikte hormon tedavisi için kullanmaktadır(3).

3- Metastatik kemik tümörlerinde, teşhis ve takip amaçlı kullanımı

Solid tümörlü vakaların yaklaşık % 25'inde, meme ve prostat kanserlerinin ise kimi yayınlarda % 80'inden fazlasında kemik dokusuna metastaz görülmektedir. Kemik metastazlarının ortaya konması oldukça güçtür ve ancak radyonüklid kemik taramalarıyla tanı konabilir. Son yıllarda yeni kemik markırları ile kemik dokusuna metastaz vakalarının yakalanabileceği iddia edilmektedir (15). Kimi yayınlarda, N ve C telopeptid seviyelerinin bu tip vakalarda sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğuna dair bulgular vardır (16,17). Hatta herhangi bir bulgu vermeden meydana gelebilecek mikro metastazların bile yakalanabileceği belirtilmiştir (3).

Bir Doku Markırında Aranılan Özellikler

Bir dokuya ait özelliklerin tanımlanmasında kullanılacak markırların kabul edilebilir olması için (Tablo 2), ilk olarak o dokuya spesifik olmalıdır. Markırın metabolizması ile ilgili tüm detaylar bilinmeli ve dolaşımında hiçbir organdan etkilenmemelidir. Markıra ait sentez ve yıkım basamaklarındaki faktörler açık olarak tanımlanmış olmalı, markır dokuya ait değişikliklere duyarlı, ölçümü kolay ve maliyeti düşük olmalıdır.

Kemik Yapım Markırları

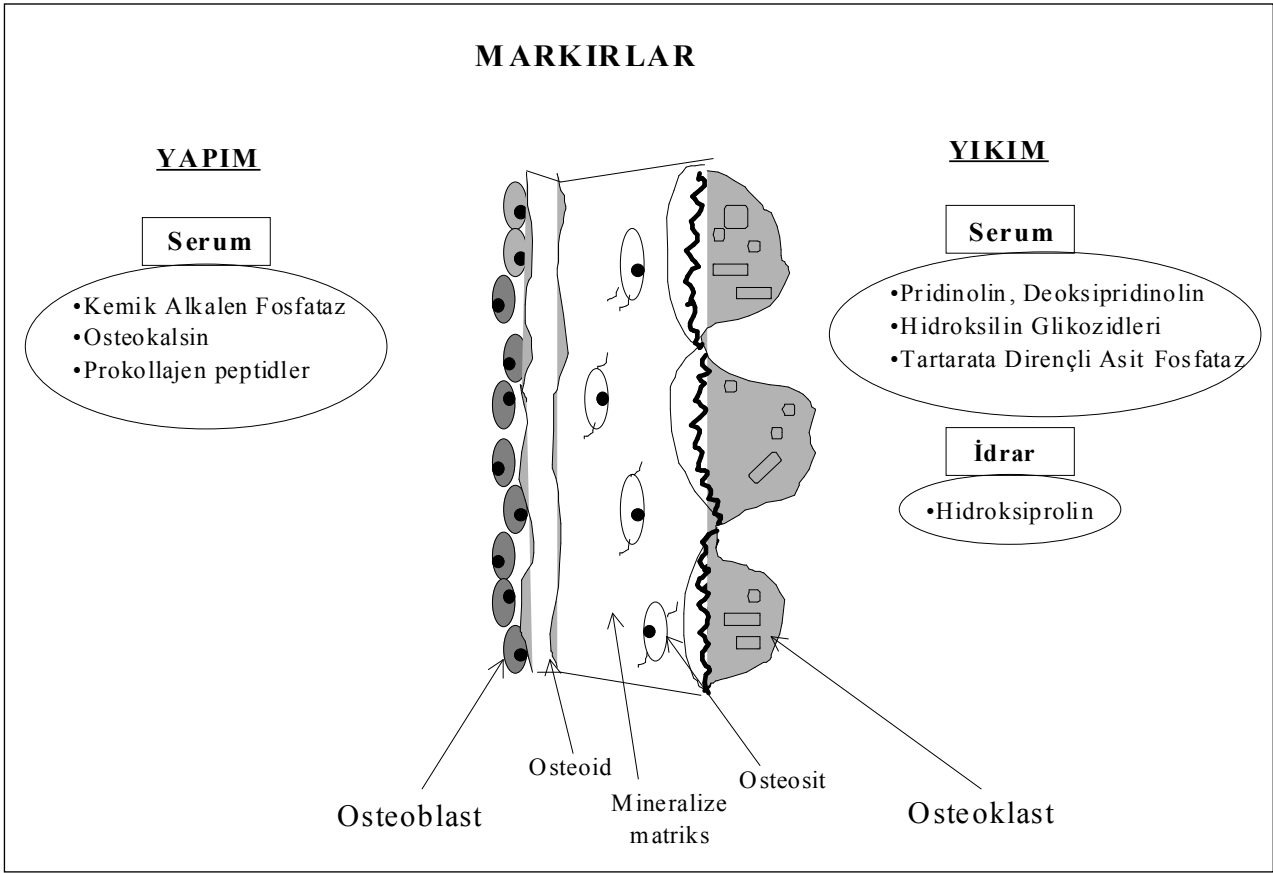
Günümüzde kemik yapımının tespitinde sıklıkla kullanılan 3 adet markır; Alkalen fosfataz, osteokalsin (kemik Gla protein) ve Tip 1 kollajenden oluşan propeptidlerdir. Yapım markırlarının en büyük avantajı idrar yerine serumdan ölçülebilmeleridir (Şekil 1).

Alkalen fosfataz

Alkalen fosfataz (ALP) osteoblastların membranlarına lokalizedir. Kemik yapımını göstermek için eskiden beri çok yaygın olarak kullanılan bir markırdır. Ancak görevi tam olarak bilinmemektedir. ALP'ın 4 çeşit izoenzimi mevcut olup kemik izoenzimi özellikle, kemik ve karaciğer hastalıklarının ayırıcı tanısında kullanılır (5,18). ALP'ın izoenzimleri, elektroforez, izoelektrik fokuslama, lektin presipitasyon ve immünassay yöntemleri ile ölçülebilirse de özgünlük ve kesinlik açısından en uygun yöntem immünassaydır (19-21). Paget hastalığında kemiğe spesifik alkalen fosfataz ölçümüne ihtiyaç yoktur çünkü, total enzim

Tablo 2. Markırlarda aranılan özellikler

- Markırlar dokuya spesifik olmalı
- Markırların metabolizması diğer organlardan minimum düzeyde etkilenmeli
- Markırın yapım ve yıkımına ilişkin tüm detaylar ayrıntılı olarak bilinmeli
- Markırlar dokuya özgün, duyarlı, ölçümü kolay ve maliyeti düşük olmalı



Şekil 1. Kemik şematik yapısı ve kemik markırları

değişiklikleri tanı için yeterlidir. Ancak osteoporoz gibi alkalen fosfataz değerlerinin normal limitler içinde oynadığı vakalarda total alkalen fosfataz ölçümleri, yeterince yardımcı olmayabilir ve izoenzim ölçümlerine ihtiyaç duyulabilir (19).

Osteokalsin

Osteokalsin, kemik Glutamik asit (Gla) protein (BGP) olarak da bilinir, kemik matrisin majör nonkollajen proteindir (5,19,22). Kemik yapımını gösteren duyarlı ve özgün bir markır olarak kabul edilir. Osteokalsinin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, hidroksiapatit kristalleri ve kalsiyumla bağlanır (19). Sentezi için aktif D-vitamini, karboksilasyonu için K-vitamini ihtiyaç duymaktadır. Kanda, parsiyel ve tam karboksilasyonlanmış iki formu bulunur. Özellikle osteoporozu olan yaşlılarda parsiyel karboksilasyonlu formunun varlığı ile kalça kırığı riskinin arttığına dair bulgular vardır (23-25). Serum ve plazmada ölçümü immünassay yöntemi ile yapılır (19). Osteokalsin yüksekliği; hiperparatiroidizm, hipertiroidizm ve kemik metastazi vakalarında görülür. Düşüklüğü, myeloma hastalığı veya glukokortikoid tedavisi gibi kemik yapımının azaldığı durumları işaret etmektedir (26). Ancak bu hastalık

durumlarında kollajen sentezinin tamamen azalması ile alkalen fosfataz enzim değerlerinin yükselmesi aynı oranda olmayabilir. Lipemik serumlarda osteokalsin labildir ayrıca eritrositlerde varolan proteolitik enzimlerle de parçalanır (27). Serum osteokalsin düzeyi yaşa bağlı artar, menoz döneminde artışına devam eder, menoz tedavisi sonrası düşer. Yeni geliştirilen insan antikoru kullanılarak yapılan sandviç immünassay yöntemi ölçüm için daha güvenilirdir (28). Serum örneklerini saklarken, mümkün olduğunca düşük ısılarda bekletmek gerekmektedir.

Prokollajen peptitler

Tip 1 kollajen, kemikte majör yapısal proteindir ve organik materyalin % 90'ını oluşturur (29). Kemige dayanıklılık esneklik ve güç kazandırır bu nedenle kemikle ilgili bilgilere ulaşmak için kollajenle ilgili markırların ölçülmesi oldukça mantıklıdır. Kollajen sentezi sırasında, N (amino) ve C (karboksi) terminalinden propeptitler dolaşıma salınır. C terminali propeptitlerinin N terminaline ait olanlara göre daha çok dolaşıma salınmasından dolayı genel ilgi C propeptitleri yönünde olmuştur. Özellikle kemik yapımının arttığı durumlarda ve büyüme döneminde yapımı oldukça artar. Tip 1 C terminal peptitleri (PICP)

immünassayle ölçülür. Ölçüm aralığı çok dar olduğu için ve kemik dışında diğer organlarda da (cilt) bulunmasından dolayı sonuçları uygun şekilde yorumlamak için daha büyük popülasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır (29,30).

Son zamanlarda tip 1 N terminal peptidlerine (PINP) ilişkin immünassay ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. N terminal peptidlerinin ilaçlara karşı kemiğin verdiği cevabını daha iyi gösterdiği kabul edilmektedir (29,31,32).

Kemik yıkım markırları

Kemik yıkımında kullanılan markırlar, kollajenden oluşan hidroksiprolin, hidroksilizin glikozidleri ve pridinolin çapraz bağlarıdır. Bu markırların sabah ilk idrar örneklerinde bakılması Paget hastalığı ve metabolik kemik hastalığının tanısında ayrıca ilaca yanıtın incelenmesinde anlamlıdır. Diğer bir yıkım markırı ise tartarata dirençli asit fosfatazdır.

Hidroksiprolin

Birkaç yıl öncesine kadar en iyi tanımlanmış ve en çok kullanılan kemik yıkım markırı hidroksiprolindi. Hidroksiprolin kollajen üzerinde varolan prolinin hidroksilasyonu ile oluşur ve kollajenin yapısında en fazla bulunan aminoasittir (5,19). Kollajenin yıkımı ile dolaşıma salınır ve hidroksiprolin ölçümü bu nedenle kemik dokusu açısından anlamlıdır. Ancak hidroksiprolinin diğer proteinlerin yapısında da bulunması yanında, diyetle alınan jelatinöz maddelerden etkilenmesi ve karaciğerde büyük kısmının metabolize olması en büyük dezavantajlarıdır (19,29,33). İlaç tedavilerine verilen yanıtın incelenmesinde sabah ilk idrar örneğinde bakılmasının iyi sonuç verdiği dair bulgular varsa da ölçüm yönteminin güç oluşu ve yonteme ait varyasyon katsayısının oldukça yüksek, kesinliğinin (precision) düşük oluşu kolorimetrik yöntemin dezavantajlarıdır. Hidroksiprolin High Performance Liquid Chromatography (HPLC) yöntemi ile de ölçülebilir (34). Sayılan nedenlerden dolayı sonuçlardan emin olmak için en az iki ölçüm yapılması önerilmektedir. Yapılan ölçümlere özen gösterildiğinde özellikle Paget hastalığında, osteoporozda ve osteoporoz tedavisine yanıtın izlenmesinde iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir (29).

Pridinolin çapraz bağları

Pridinolin (Pyd) ve deoksipridinolin (Dpd) diğer isimleriyle hidroksilzilid pridinolin ve lizil pridinolin son zamanların en dikkat çekici kemik yıkım markırlarıdır. Her ikisinin görevi, ekstrasellüler matriks içindeki kollajen molekülünün stabilizasyonunu sağlamaktır. Kemikte Pyd/Dpd 3/1 oranında bulunur ancak Dpd büyük ölçüde kemik dokusuna özgüdür (35). İdrarla atılan çapraz bağların %40'ı serbest formda geri kalanı ise peptide bağlı olarak bulunur (19). Ölçümleri için referans metot floresan dedektörlü reverse phase HPLC dir. Ancak bu yöntem oldukça zahmetli ve zaman harcayan bir yöntemdir. Bunun yerine son zamanlarda geliştirilen immünassay yöntemler oldukça ümit vermektedir (36). Ancak popülasyon çalış-

malarının yetersizliği nedeniyle bu yöntemin de istenilen düzeye ulaşması zaman alacaktır. Pridinolin diyetten büyük ölçüde etkilenmez ve metabolize olmaz (37). Aynı zamanda her bir kollajen molekülü başına 0.007mol pridinolin oluştuğu düşünülürse, bize kemik yıkımı hakkında kantitatif bir sonuç verebilir (5,29).

Pridinolinler, çocukluk çağında ve menopoz sonrasında yüksek miktarda idrarla atılırlar. Ayrıca bazı endokrin hastalıklarda (hipertiroidizm) ve tümöral vakalarda da yüksek miktarda buldukları bildirilmiştir. Sabahki ilk ve 24 saatlik idrar örnekleri incelendiğinde pridinolin çapraz bağlarının sirkadiyen bir ritm gösterdikleri saptanmıştır. Sabahki ilk idrar ölçümleri yerine 24 saatlik örneklerde çalışılması tercih edilmektedir (29).

Bugünkü teknik gelişmeler, pridinolin çapraz bağlarının ölçümünü neredeyse alkalin fosfataz ölçümleri kadar kolaylaştırmaktadır. İdrar dışında serum örneklerinde de ölçülebilmesi kemik yıkımında en güvenilir markırın pridinolin çapraz bağları olabileceğini düşündürmektedir (29).

Hidroksilizin Glikozidleri

Hidroksilizin glikozidleri de tip 1 kollajenin yapısında bulunur. Aynı hidroksiprolin gibi hidroksilizin glikozidleri de prolinde oluşur. Hidroksiprolinden daha spesifik oldukları için osteoporozda daha güvenilir bir markırdır. Hidroksilizin glikozidleri günümüzde HPLC yöntemiyle zor ve zahmetli bir biçimde ölçülse de bu yöntem, serum ölçümleri için de oldukça uygun bir yöntemdir (38).

Tartarata Dirençli Asit fosfataz (TRAP)

Asit fosfataz prostat, kemik, trombosit ve eritrosit gibi birçok dokuda bulunan lizozomal bir enzimdir. İzoenzimleri elektroforez yöntemiyle tanımlanabilir. Tip 5 izoenzimi sadece kemik dokusunda osteoklastlarda bulunur. Aynı zamanda bu izoenzim tartarata dirençli olmasıyla da diğerlerinden ayrılır. TRAP, kemik yıkımının arttığı hastalık durumlarında artar, ancak ölçümü enzimin stabilitesinin kötü oluşu ve ölçüm sınırlarının çok dar olması nedeniyle zordur. Son zamanlarda geliştirilen tip 5 izoenzimine özgü immünassay yöntemleri ile, kemik yıkımının tanımlanmasında daha iyi sonuçlar alınabilmektedir (39). Buna rağmen pridinolin çapraz bağ ölçümlerine üstün değildir. Serumda TRAP ölçümleri plazmadakinden yüksektir bunun nedeni pıhtılaşma sırasında plateletlerden bol miktarda TRAP salınmasıdır (5,19).

Sonuç

Kemik markırları, noninvaziv, maliyeti düşük ve kolaylıkla tekrar edilebilir testlerdir. Markırlardan, osteoporozun patogenezi araştırma ve ilaçların etki mekanizmalarını anlamada yararlanılabilir. Ayrıca markırlar klinik anlamda, osteoporoz teşhisinde, osteoporoz için en uygun tedavinin seçiminde, tedaviye cevabın en erken safhada saptanmasında, hızlı kemik kaybına uğrayanları tespit etme ve

kırık riskinin araştırılmasında kullanılabilir. Kemikle ilgili daha birçok konuda, markırlara başvurulabilmesi ve uygun markır seçimi için daha büyük popülasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Demers LM, Kleerekoper M. Advances in biochemical markers of bone turnover. *Clin Chem* 1994; 40: 1994-5.
- Raisz LG, Wiita B, Artis A, Bowen A, Schwartz S, Trahiotis M, Shoukri K, Smith J. Comparison of effects of estrogen alone and estrogen plus androjen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 37-43.
- Demers LM. Clinical usefulness of markers of bone degradation and formation. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57(Suppl 227): 12-20.
- Igbal MM. Osteoporosis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *South Med J* 2000; 93(1): 2-18.
- Garnero P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1998; 27(2): 303-23.
- Christenson R. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; 30: 573-93.
- Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med* 2000 Sep; 20(3): 489-501.
- Kung AW, Lorentz T, Tam SC. Thyroxin suppressive therapy decreases bone mineral density in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 1993; 39: 535-40.
- Garnero P, Vassy V, Bertholin A, Riou JP, Delmas PD. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 955-9.
- Hanania NA, Chapman KR, Sturtridge WC, Szalai JP, Kesten S. Dose related decrease in bone density among asthmatic patients treated with inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 571-9.
- Reeve J, Loftus J, Hesp R, Ansell BM, Wright DJ, Woo PM. Biochemical prediction of changes in spinal bone mass in juvenile chronic (or rheumatoid) arthritis treated with glucocorticoids. *J Rheumatol* 1993; 20: 1189-95.
- Marshall LA, Cain DF, Dmowski WP, Chesnut CH. Urinary N-telopeptides to monitor bone resorption while on GnRH agonist therapy. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 350-4.
- Blumsohn A, Hannon RA, Wrate R, et al. Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 663-70.
- Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C. Bone markers in clinical practice. *Curr Opin Rheumatol* 1999 Jul; 11(4): 312-9.
- Lipton A, Demers L, Daniloff Y, et al. Increased urinary excretion of pyridinium crosslinks in cancer patients. *Clin Chem* 1993; 39: 614-8.
- Demers L, Costa L, Chinchilli VM, Gaydos L, Curley E, Lipton A. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin Chem* 1995; 41: 1489-149.
- Pechersotfer M, Zimmer Roth I, Schilling T, et al. The diagnostic value of urinary pyridinium crosslinks of collagen, serum total alkaline phosphatase and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 97-103.
- Christenson RH, Panigrahi K, Chapman JC, Silverman LM. Isoenzymes and isoforms. In: *Clinical Chemistry Theory, Analysis, Correlation*. 3rd ed. (Eds. Kaplan LA, Pesce AJ). St. Louis: Mosby-Year Book Inc. 1996: 1077-85.
- Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45:8(B): 1359-68.
- Gomez BJ, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase in serum. *Clin Chem* 1995; 41: 1560-16.
- Farley JR, Chesnut CH, Baylink DJ. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem* 1981; 27: 2002-7.
- Fottrell PF, Power MJ. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991; 28: 287-335.
- Delmas PD, Christiansen C, Mann KO, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 5-11.
- Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993;91:1769-74.
- Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breat G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 719-24.
- Bataille R, Delmas P, Sany J. Serum bone gla-protein in multiple myeloma. *Cancer* 1987;59: 329-34.
- Delmas PD, Christiansen C, Mann KO, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 5-11.
- Garnero P, Grimaux M, Demiaux B, et al. Measurement of serum osteocalcin with a human osteocalcin generated in vivo an in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 255-64.
- Russell RGG. The assesment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm Metab Res* 1997; (29): 138,144.
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (crosslaps): follow up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 864-8.
- Hanson DA, Weis MAE, Bollen AM, Maslan SI, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1251-8.
- Melkko J, Kauppila S, Niemi S, et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type 1 procollagen. *Clin Chem* 1996; 42: 947-54.
- Kleerekoper M, Edelson GW. Biochemical studies in the evaluation and management of osteoporosis: current status and future prospects. *Endocrin Pract* 1996; 2: 13-9.
- Wilson PS, Kleerekoper M, Bone H, Parfitt AM. Urinary total hydroxyproline measured by HPLC: comparison of spot and timed urine collections. *Clin Chem* 1990; 36: 388-9.
- Seibel MJ, Robins SP, Bilezikiau JP. Urinary pyridinium crosslinks of collagen. *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3: 263-70.
- Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, et al. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker for bone resorption. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 635-41.
- Colwell A, Russell RGG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 341-9.
- Krane SM, Kantrowitz FG, Byrne M, et al. Urinary excretion of hydroxylysine and its glycosides as an index of collagen degradation. *J Clin Invest* 1977; 59: 819-27.
- Seibel MJ, Woitge HW. Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone metabolism: biochemical and technical aspects. *J Clin Densitom* 1999 Fall; 2(3): 299-321.