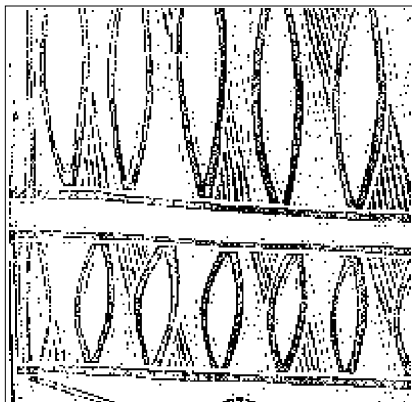


Caleidoscopio

Italiano



Fernando Rosa
Eugenio Lanfranco
Enrico Balleari
Giulio Massa
Riccardo Ghio

Marcatori biochimici del rimodellamento osseo

*Divisione Patologia Medica B.
D.I.M.I - Università di Genova*

88

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

 **MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1994

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Endocrinologia, di Patologia Clinica o di particolare interesse in altri campi della Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile in base alla loro esperienza e competenza. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, purché redatte secondo le regole editoriali e conformi allo spirito della Rivista.

TESTO. In considerazione del carattere didattico, la monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati, è opportuno evitare di riportare contrastanti o solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte, in rapporto anche al numero di tabelle e figure. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio. Tutte le pagine del testo devono essere scritte a spaziatura 2, con sufficienti margini e numerate consecutivamente.

TABELLE E LE FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di comparsa nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Si consiglia la realizzazione di disegni e figure con una larghezza non superiore ai 9 cm. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le illustrazioni. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, l'eventuale Clinica o Istituto di lavoro, l'indirizzo compreso il numero di telefono e fax.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'*Index Medicus* e lo stile illustrato negli esempi:

1) Bjorklund B., Bjorklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati europee e statunitensi (per esempio: Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo archiviata su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

E' inoltre necessario accompagnare il lavoro da copie di ogni permesso di riprodurre materiale pubblicato o di usare illustrazioni che possono far riconoscere soggetti umani.

Il dattiloscritto originale, le figure e le tabelle devono essere spedite al Direttore Responsabile in duplice copia. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cento copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Editoriale

Il medico ha oggi a disposizione numerosi mezzi diagnostici per affrontare e diagnosticare le patologie che interessano l'osso.

Oltre al basilare esame clinico, sia il laboratorio come la radiologia e l'esame istologico possono permettere una corretta valutazione e diagnosi.

L'osso, come è stato ormai chiaramente dimostrato, è un tessuto caratterizzato da una importante attività metabolica e sottoposto a continuo modellamento e rimodellamento. Può essere studiato sotto questo aspetto ricorrendo oggi a mezzi che sino a qualche anno fa non erano disponibili.

Questo ha un rilievo sociale ed economico notevolissimo se si pensa che l'osteoporosi, la più frequente malattia metabolica dell'osso, è uno dei problemi principali dell'anziano. Infatti il costo per la frattura del collo del femore (una delle principali complicazioni dell'osteoporosi), in Italia nel solo 1988, è stato di circa 440 miliardi e costituisce un valore in continua crescita.

Poiché è attesa una crescita percentuale nel mondo della popolazione oltre i sessantacinque anni, si dovrebbe dare una priorità assoluta alla prevenzione delle malattie croniche dell'anziano, come appunto l'osteoporosi.

Questo tipo di approccio oggi è già praticabile. E' possibile individuare e quindi trattare in modo mirato sin dall'esordio le pazienti in cui la perdita ossea è accelerata.

Sicuramente il dosaggio del piridinium crosslinks e della fosfatasi acida tartrato resistente con un anticorpo monoclonale osso-specifica rappresentano il più tangibile miglioramento in questa area, ma il pregio di questa monografia è proprio quello di riassumere tutti quelli che oggi sono i marcatori biochimici di rimodellamento osseo dando un quadro globale molto chiaro ed obiettivo della situazione attuale.

Il volume si presenta completo anche per la presenza di una prima parte generale dedicata alla struttura del tessuto osseo seguita da una parte dedicata alla regolazione e valutazione dei processi di modellamento e rimodellamento ed una valutazione di questi indici nelle principali patologie scheletriche.

Una breve presentazione degli Autori.

Il dott. Fernando Rosa, laureato in Medicina e Chirurgia è specialista in Ematologia Generale ed in Medicina Interna; collabora con la Cattedra di Terapia Medica Sistemática dell'Università di Genova diretta dal Prof. R. Ghio. Si è interessato di problematiche clinico-terapeutiche in oncoematologia (in particolare del Mieloma Multiplo) ed attualmente degli indici biochimici e dei meccanismi patogenetici del rimodellamento osseo.

Il dott. Eugenio Lanfranco, laureato in Medicina e Chirurgia è specialista in Ematologia Clinica e di laboratorio ed in Igiene di laboratorio. E' medico specialista e collabora con la Cattedra di Terapia Medica Sistemática dell'Università di Genova.

Si è occupato del dosaggio dei marcatori tumorali e dell'uso dei più recenti indici biochimici di rimodellamento osseo.

Il dott. Enrico Balleari, laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Genova nel 1982, è specialista in Reumatologia e Medicina Interna. E' aiuto ospedaliero presso il Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Genova e si è occupato di meccanismi patogenetici delle malattie reumatiche.

Il Prof. Giulio Massa è specialista in Ematologia clinica e di laboratorio, Medicina generale ed Oncologia. E' professore associato di Terapia Medica Sistemática dal 1992 presso la stessa Università. Si è interessato di chemioterapia antitumorale con particolare riguardo alla valutazione in modelli sperimentali e nell'uomo delle variazioni del corredo staminale emopoietico ed al danno al microambiente da parte degli antitumorali ed allo studio dei fattori di crescita emopoietici e degli immunomodulatori.

Il Prof. Riccardo Ghio è specialista in Ematologia Clinica e di Laboratorio, Oncologia e Medicina Interna. Dal 1980 è professore associato di Terapia Medica Sistemática ed attualmente svolge funzioni primarie presso la Divisione di Patologia Medica I dell'Università di Genova. Si è occupato dello studio dei meccanismi di regolazione dell'emopoiesi sia in vivo che in vitro mediante la messa a punto di metodiche di coltura in vitro e di dosaggio dei fattori di crescita emopoietici sia in condizioni di emopoiesi fisiologica che in varie condizioni oncoematologiche.

Sergio Rassa

Introduzione

L'osso va fisiologicamente incontro a vivaci processi metabolici che gli permettono di espletare efficacemente le funzioni cui è preposto (sostegno, deposito di calcio, emopoiesi).

Le alterazioni del suo metabolismo sono alla base di numerose malattie scheletriche: tratteremo in sintesi del loro studio utilizzando le più recenti metodiche di patologia clinica.

Questo rende necessaria una premessa circa la struttura del tessuto osseo ed i meccanismi di regolazione dei processi metabolici che avvengono. Verranno poi esaminate singolarmente le tecniche utilizzate nello studio del metabolismo scheletrico ed il loro uso nelle principali patologie ossee.

Il tessuto osseo

Dal punto di vista istologico, l'osso è costituito da un tessuto connettivo la cui componente cellulare è immersa nella sostanza fondamentale, a sua volta rappresentata da fibre collagene e sostanza organica amorfa, entrambe impregnate di sali minerali.

Le cellule del tessuto osseo sono gli osteoclasti, gli osteoblasti e gli osteociti.

Gli **osteoclasti** sono cellule di grandi dimensioni (da 20 a 100 μ di diametro), plurinucleate (sino ad un centinaio di nuclei) che, al microscopio ottico, presentano un citoplasma debolmente acidofilo. La superficie della cellula presenta una parte, occupata come si dirà nell'attività di riassorbimento, con l'aspetto ad orletto striato, che, al microscopio elettronico, appare costituito da microvilli.

L'indagine ultrastrutturale dimostra come queste cellule siano deputate al riassorbimento: sono povere in organelli per la sintesi e la maturazione di proteine (ribosomi, reticolo endoplasmatico rugoso, apparato di Golgi), mentre contengono in abbondanza lisosomi

ricchi di enzimi idrolitici. Fra questi particolare importanza ha la fosfatasi acida che si caratterizza per la sua tartrato-resistenza (20, 109).

Gli osteoclasti originano da precursori midollari della serie monocito-macrofagica. Le prime fasi dello sviluppo si verificano ad opera del Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), le fasi successive sotto l'influsso dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (44). La loro funzione principale è rappresentata dal riassorbimento osseo.

Gli **osteoblasti** sono cellule ad attività secernente che producono le componenti organiche della matrice ossea. Si tratta, infatti, di elementi voluminosi, ovoidali o prismatici, con citoplasma basofilo, ricco di granuli PAS positivi e di un enzima caratteristico, la fosfatasi alcalina.

L'osservazione in microscopia elettronica conferma la loro attitudine alla secrezione: il reticolo endoplasmatico rugoso è ben sviluppato, i ribosomi sono numerosi e l'apparato di Golgi evidente (20, 109).

Gli osteoblasti originano da precursori stromali che si trovano nel midollo; il loro sviluppo si verifica sotto l'influsso di numerosi fattori tra i quali i principali sono rappresentati dal paratormone (PTH), dagli ormoni tiroidei, dall'ormone della crescita (hGH), dal Transforming Growth Factor (TGF- β), dall' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, da prostaglandine (PGE_2) e da estrogeni (44). (Figura 1)

Gli **osteociti**, infine, sono cellule di dimensioni ridotte, con nucleo a cromatina addensata e citoplasma basofilo. Da esse si dipartono prolungamenti ramificati che sono accolti, come si dirà, nei canalicoli ossei. Queste cellule originano per trasformazione degli osteoblasti e sono presenti nell'osso allo stato quiescente. In certe condizioni esse possono diventare simili agli osteoblasti, acquisendo così capacità secernente: entrano probabilmente in gioco nella riparazione di microfratture (20, 109).

La sostanza fondamentale è costituita da fasci di collagene immersi in una componente amorfa, l'osteomucoide.

Il **collagene** è una proteina la cui struttura primaria è costituita da una sequenza ripetitiva di tre aminoacidi. Uno di essi è la glicina, mentre gli altri due corrispondono spesso alla prolina, all'idrossiprolina e all'idrossilisina, aminoacidi poco frequenti nelle proteine diverse dal collagene.

Questi aminoacidi formano una molecola elicoidale con un passo di 0,93 nm, costituita da tre catene polipeptidiche uguali o diverse fra

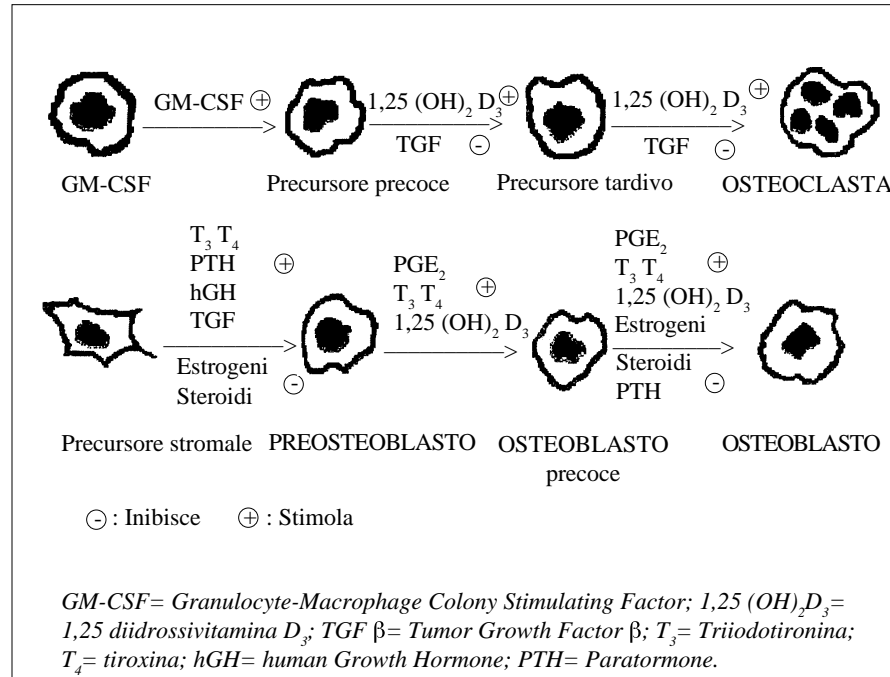


Figura 1. Differenziazione di osteoclasti ed osteoblasti.

loro della lunghezza di circa 280 nm, dello spessore di 1,5 nm e del peso complessivo di circa 300.000 dalton. Il collagene presente nell'osso è formato da due catene α -1 e da una catena α -2.

È definito collagene di tipo I ed ha l'importante caratteristica di essere praticamente specifico per lo scheletro, mentre esistono in vari tessuti altri nove tipi di collagene a struttura diversa.

Il collagene I è prodotto dagli osteoblasti a partire da una molecola precursore di dimensioni superiori (procollagene I), che subisce fondamentali processi di modificazione post-trascrizionale. Nel reticolo endoplasmatico dell'osteoblasto la catena polipeptidica del procollagene I va incontro ad una idrossilazione dei residui di prolina e lisina e successivamente ad una glicosilazione ed alla formazione di ponti disolfuro che stabilizzano la molecola.

Le molecole del precursore, giunte all'apparato di Golgi, vengono raccolte in vescicole di secrezione, trasportate sulla superficie della cellula ed infine espulse nello spazio extracellulare. In questa sede peptidasi amino- e carbossi terminali rimuovono alcuni peptidi

dando origine alla molecola di collagene vera e propria. I frammenti rimossi, specie quelli C-terminali, sono importanti perché il loro dosaggio è utilizzabile nella valutazione dell'attività di osteoproduzione (20, 38).

Nella matrice extracellulare, infine, a partire dall'idrossiprolina, idrossilisina e loro derivati, fra le molecole di collagene adiacenti si formano legami aldiminici riducibili che si trasformano in composti maturi non riducibili.

Queste molecole, unite fra loro, danno origine ad una caratteristica struttura piridinolinica ciclica. La più rappresentata è la lisilpiridinolina, presente significativamente solo nel tessuto osseo; l'idrossilisilpiridinolina costituisce il 21-22% del totale dei legami crociati (7).

Per formare il collagene propriamente detto le fibre si raggruppano ordinatamente l'una parallela all'altra, formando lamelle di diametro compreso fra 4 e 11 μ (20).

La componente amorfa è costituita da un gruppo di molecole proprie della matrice e da alcune che provengono dal plasma circolante.

L'**osteocalcina** (OC) è la proteina della matrice più studiata e costituisce il 15-20% delle proteine non collagene del tessuto osseo. E' codificata da un gene presente, come quello per la fosfatasi alcalina, sul cromosoma 1 (122); essa ha una struttura primaria di 49 aminoacidi con un peso molecolare di 5800 dalton; tre residui di acido glutammico (in posizione 17, 21 e 24) vengono carbossilati in posizione ad opera di un enzima vitamina K- dipendente analogamente ad alcuni fattori della coagulazione. La sua struttura primaria si è conservata nel corso dell'evoluzione al punto tale che fra l'osteocalcina umana e quella bovina la sequenza aminoacidica è comune al 90%, elemento questo di notevole importanza per l'allestimento di kit diagnostici. Nello spazio questa molecola ha per il 40% una struttura ad α -elica, con due eliche antiparallele che si affrontano, il resto presenta una struttura β (118).

Come il collagene, anche questa molecola è secreta dagli osteoblasti, mentre una quota di entità trascurabile è prodotta dagli odontoblasti, le cellule del dente corrispondenti agli osteoblasti. Nel processo secretivo si ha prima la produzione di un precursore (pre-pro-OC), del p.m. di 13.500 dalton dal quale origina per il distacco di alcuni peptidi la molecola definitiva (23); quest'ultima si lega strettamente attraverso gli aminoacidi γ -carbossilati all'idrossiapatite dell'osso. E'

stata osservata anche una sua azione chemiotattica sui monociti e di inibizione dell'elastasi leucocitaria (122).

La sintesi dell'OC è regolata principalmente dall' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che è in grado di aumentarne la sintesi sino a sei volte (119, 121). La sua precisa funzione è ignota anche se pare possa intervenire nella regolazione dell'ossificazione.

La **Gla proteina della matrice** è una proteina non collagena del peso di circa 10.000 dalton con una struttura primaria simile all'OC e, come questa, subisce una α -carbossilazione in 5 residui di acido glutammico. Non è tuttavia specifica per il tessuto osseo in quanto è possibile ritrovarla anche nella cartilagine (38, 31, 61).

Nell'osso si possono ritrovare anche alcune fosfoproteine e glicoproteine. Fra le fosfoproteine la più nota è l'**osteonectina**, del p.m di 32.000 dalton, che rappresenta il 15% del contenuto totale di proteine non collagene dell'osso. Essa si lega sia con il collagene che con l'idrossiapatite, disponendosi in modo da favorire la deposizione minerale. Oltre che nello scheletro, tuttavia, si ritrova nei tendini, nei legamenti periodontali e viene anche secreta dalle piastrine in seguito a stimolazione con trombina (38, 144). Nell'osso sono state descritte altre tre fosfoproteine del p.m. di 75.000, 62.000 ed una di 24.000 dalton ricca in idrossiprolina (38).

Le glicoproteine sono rappresentate da proteoglicani e sialoproteine. I proteoglicani sono caratterizzati da un nucleo proteico al quale sono legati dei glicosaminoglicani: essi sono presenti anche nella cartilagine e permetterebbero l'unione e/o la maturazione delle matrici con la base collagena (38).

Le sialoproteine contengono acido sialico (acido N-acetilneuraminico). Fra esse è stata descritta una sialoproteina fosforilata di 301 aminoacidi e 41.500 di p.m. l'**osteopontina**. Questa molecola si lega all'OC formando un complesso che potrebbe avere importanza nel reclutamento degli osteoclasti nel processo del rimodellamento osseo (129).

Nel tessuto osseo, infine, è presente una certa quota di proteine provenienti dal siero: **albumina**, **glicoproteina HS**, **transferrina** ed alcune classi di **immunoglobuline**.

Nella figura 2 sono indicate le componenti non collagene dell'osso.

La componente organica dell'osso è impregnata di sali minerali. Calcio, fosforo e magnesio sono gli elementi che ne costituiscono il 60% circa in peso. Calcio e fosforo assumono principalmente una

struttura cristallina simile all'idrossiapatite, ma generano anche strutture amorfe. E' importante ricordare che il pirofosfato è un inibitore della crescita dei cristalli di idrossiapatite; la sua distruzione ad opera della fosfatasi alcalina degli osteoblasti, permette il processo di rimodellamento osseo. Sono infine presenti anche altri elementi, tuttavia in minori quantità.

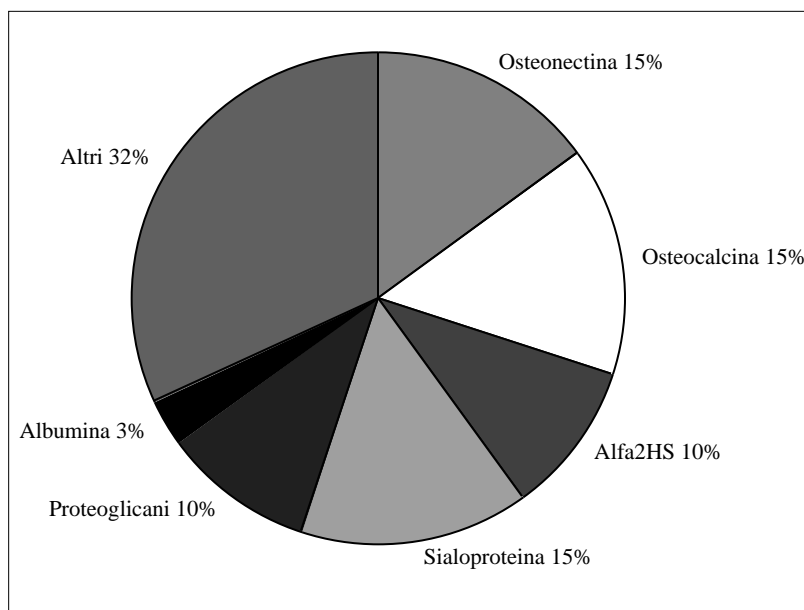


Figura 2. Componenti non collagene della sostanza fondamentale ossea.

Struttura dell'osso

Le componenti precedentemente descritte, che formano il tessuto osseo, si organizzano in modo da determinare due diversi tipi di struttura che si ritrova nello scheletro: l'osso compatto e l'osso spugnoso.

L'**osso compatto** è tipico delle diafisi delle ossa lunghe. In esso lamelle di collagene del diametro variabile da 4 ad 11 μ , in numero da 3 a 20, si dispongono concentricamente attorno ad un canale centrale (di Havers) contenente vasi e nervi; da quest'ultimo si dipartono altri canalicoli di calibro inferiore (canali di Volkmann) che provengono dal periostio e dall'endostio. Questa struttura assume aspetto cilindrico e rappresenta l'unità anatomica fondamentale dell'osso detta osteone.

Intorno a ciascun osteone si trova uno strato di sostanza fondamentale che, in sezione, si presenta come una linea basofila (linea cementante di Ebner). Fra un osteone e l'altro si osservano gruppi di lamelle disposti irregolarmente che, in parte, derivano da vecchie strutture haversiane che sono state riassorbite.

L'**osso spugnoso**, invece, è caratteristico delle ossa brevi, tipicamente dei corpi vertebrali, dove trabecole delimitano cavità in cui è presente midollo osseo.

In questo tipo di osso le lamelle si organizzano in una struttura appiattita e di forma irregolare ed i sistemi osteonici sono spesso incompleti e sprovvisti dei canali di Volkmann (20, 44).

Modellamento e rimodellamento OSSEO

L'osso, nel corso della vita, va incontro ad importanti modificazioni legate all'accrescimento corporeo che possono essere schematizzate in tre fasi distinte.

Dal concepimento sino alla fine del periodo di accrescimento (saldatura delle epifisi) si ha un progressivo aumento del volume osseo sia trabecolare che corticale; successivamente si osserva un ispessimento a carico dell'osso corticale (fase di consolidamento).

Verso i 35-40 anni viene raggiunto il valore più elevato di massa ossea determinato per il 90-95% dall'accrescimento e per il 5-10% dal consolidamento (picco di massa ossea). Il picco di massa ossea dell'adulto è nel maschio superiore del 25-30 % circa rispetto alla femmina e di circa il 10% nella popolazione di colore rispetto alla popolazione di razza bianca (105).

Tutti i meccanismi che aumentano le dimensioni delle ossa e ne adattano la forma ai carichi meccanici vengono definiti **modellamento**.

L'osso deve essere tuttavia anche in grado di resistere sempre in maniera adeguata alle sollecitazioni meccaniche alle quali viene sottoposto: a questo scopo il tessuto osseo neoformato risulta più efficace rispetto al tessuto più vecchio. Il **rimodellamento** osseo è pertanto un costante processo di riassorbimento e di rinnovo tessutale il cui scopo è principalmente la salvaguardia dell'efficienza meccanica dello scheletro e la prevenzione dei danni da affaticamento

Questo fenomeno interessa quei "mattoni" costitutivi dell'osso che sono le unità strutturali definite BMUs (Basic Multicellular Units) descritte nel 1969 da Frost. Le BMUs sono costituite dalle cellule del tessuto osseo (osteoclasti, osteoblasti ed osteociti) e dalla sostanza fondamentale circostante, tenute insieme da tessuto connettivo altamente mineralizzato, ma quasi privo di collagene. Queste unità funzionali corrispondono anatomicamente agli osteoni.

Il rimodellamento osseo si verifica in focolai distinti attivi da 4 ad 8 mesi. Esso viene separato in cinque fasi:

1) **quiescenza**: durante questa fase il tessuto è a riposo dal punto di vista funzionale: è il periodo tra un ciclo e l'altro di rimaneggiamento.

2) **attivazione**: comincia a verificarsi ad opera di vari fattori il reclutamento degli osteoclasti. Le cellule della zona di confine hanno l'importante ruolo di ritirarsi per permettere l'accesso degli osteoclasti alla matrice ossea. Nell'inizio del ciclo di rimodellamento hanno probabilmente importanza le microfratture.

3) **riassorbimento**: gli osteoclasti cominciano a scavare una cavità ossea (lacuna di Howship): durante tale fase rivolgono l'orletto striato verso la zona riassorbita. Queste cellule presentano una pompa protonica che, riducendo il pH extracellulare, rende possibile l'azione degli enzimi litici lisosomiali che funzionano in ambiente acido.

4) **inversione**: nelle parti più profonde della lacuna gli osteoclasti multinucleati vengono rimpiazzati da elementi mononucleati e, successivamente, compaiono pre-osteoblasti che si trasformeranno nelle cellule mature ad attività secretiva.

5) **formazione**: gli osteoblasti secernono nella cavità uno strato di matrice ossea (tessuto osteoide) che andrà incontro progressivamente a mineralizzazione. Dopo qualche tempo dall'inizio della produzione di osteoide si verifica la deposizione di sali minerali che continua anche dopo la fine della formazione della matrice.

Gli osteoblasti diventano a questo punto più piatti e larghi, riducono la basofilia e le dimensioni del loro citoplasma sino alla trasformazione in cellule quiescenti (osteociti) prive di capacità secernente (44, 105, 109).

Le differenze fra modellamento e rimodellamento sono indicate nella tabella 1.

| | Rimodellamento | Modellamento |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Tempo | Ciclico | Continuo |
| Sito di R e F | Stessa superficie | Diverse superfici |
| Portata | 20% superficie | 100% superficie |
| Attivazione ^a | Necessaria | Non necessaria |
| Tasso di apposizione | 0,3 a 1,0 $\mu\text{m}/\text{d}$ | 2 a 20 $\mu\text{m}/\text{d}$ |
| Bilancio | Perdita netta | Guadagno netto |
| Accoppiamento | Locale | Sistemico |

R = riassorbimento; F = formazione
a = Nel senso di trasformazione della superficie da quiescente ad attiva.

Tabella 1. Differenze tra il rimodellamento ed il modellamento. (Modificata da Parfitt).

Regolazione del rimodellamento

Il processo di rimodellamento viene influenzato da numerosi fattori umorali generali e locali (tabella 2).

| Sistemici | |
|---------------------------------|--|
| Paratormone | Estrogeni |
| 1,25 diidrossivitamina D | Androgeni |
| Calcitonina | Glucocorticoidi |
| Ormoni tiroidei | Ormone della crescita |
| Locali | |
| Interleuchine 1 e 6 | Granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| Tumor necrosis factors | Peptide correlato al Paratormone |
| Insulin like growth factors | Epidermal growth factor |
| Transforming growth factors | Interferone gamma |
| Platelet derived growth factor | Fibroblast growth factors |
| Prostaglandine | 2 microglobulina |
| Proteine morfogeniche dell'osso | Peptide correlato al gene della calcitonina |
| V.I.P. | Macrophage colony stimulating factor |

Tabella 2. Fattori agenti sul rimodellamento osseo.

E' noto da tempo come vari ormoni (paratormone, calcitonina, GH, ormoni sessuali, ormoni tiroidei e glicocorticoidi) e l'1,25 (OH)₂D₃ abbiano una notevole influenza sulle cellule dell'osso.

Il più importante ormone che regola il metabolismo osseo è il **paratormone (PTH)** prodotto dalle paratiroidi. Esso è il principale regolatore della quantità di calcio circolante: ne aumenta la liberazione dall'osso, ne diminuisce l'escrezione urinaria mentre aumenta la secrezione tubulare di fosfato ed infine, aumentando la produzione di 1,25 (OH)₂D₃, stimola indirettamente il riassorbimento intestinale. Sull'osso la sua azione complessiva è quella di attivare il rimodellamento. Il PTH non ha, tuttavia, soltanto una azione di stimolo sul riassorbimento scheletrico, ma può anche avere una azione anabolica sull'osso (53): nell'osteite fibroso cistica dell'iper-

paratiroidismo, infatti, accanto all'osteopenia si osservano aree osteosclerotiche; ciò è di notevole importanza al punto che è stato proposto di utilizzare il PTH a piccole dosi nel trattamento dell'osteoporosi. Anche il sistema della **vitamina D** ha fondamentale importanza nella regolazione del metabolismo calcio-fosforo. Questa vitamina, che ha una vera e propria funzione ormonale, viene prodotta nella cute per fotolisi dal 7-deidrocolesterolo ad opera dei raggi ultravioletti; da ciò deriva un precursore che, dopo isomerizzazione dei doppi legami, dà origine alla vitamina D vera e propria, che viene immessa in circolo. Essa subisce una idrossilazione in sede epatica in posizione 25 dando origine alla 25 OH D₃, forma circolante priva di attività biologica ma con importanti funzioni di trasporto e di riserva; a livello renale, per l'azione dell'1-idrossilasi dei tubuli renali, la 25 OH D₃ si trasforma nel metabolita attivo 1,25 (OH)₂D₃. La sua azione si verifica a livello intestinale stimolando l'assorbimento del calcio da parte della mucosa; in questo modo media l'azione del PTH che, a livello intestinale, agisce appunto per stimolo della sintesi di 1,25 (OH)₂D₃: questo è un importante punto di contatto fra i sistemi dei due ormoni. L' 1,25 (OH)₂D₃ inoltre esercita una inibizione sulla secrezione di PTH a livello paratiroideo. Sull'osso il sistema della vitamina D determina una attivazione degli osteoblasti a produrre collagene ed osteocalcina (40).

Nella regolazione del metabolismo fosfo-calcico interviene anche un ormone prodotto dalle cellule parafollicolari della tiroide, la **calcitonina**, che esercita un effetto di inibizione sugli osteoclasti e di stimolazione dell'assorbimento intestinale del calcio agendo sull'1-idrossilasi renale.

L'**ormone della crescita** (GH) è fondamentale nell'accrescimento scheletrico, ma non è ben chiaro se, e come, agisca nel mantenimento della massa ossea, anche se dati recenti sottolineano l'importanza dell'IGF-1, mediatore della sua azione periferica. Per quel che riguarda gli **steroidi surrenalici** essi hanno una azione inibitoria sugli osteoblasti, mentre gli **ormoni tiroidei** collaborano all'accrescimento scheletrico; un livello circolante eccessivamente elevato quale si osserva nell'ipertiroidismo causa un aumento di perdita ossea (91).

Anche gli **ormoni sessuali** maschili e femminili hanno una importanza fondamentale nel mantenimento di una adeguata massa ossea: perdita di osso è infatti presente in tutte le condizioni di ipogonadismo e nell'osteoporosi postmenopausale. Recentemente sono stati anche descritti sulla superficie cellulare di osteoclasti ed

osteoblasti i recettori per gli estrogeni che potrebbero spiegare il motivo della perdita ossea in postmenopausa da moltissimi anni attribuita alla carenza estrogenica (43).

Malgrado la possibile azione diretta sulle cellule ossee tramite i recettori precedentemente citati, oggi si pensa che siano fattori prodotti localmente (prostaglandine e citochine) ad agire come mediatori degli ormoni sistemici ed intervenire nello stimolo del riassorbimento in corso di altre situazioni patologiche (neoplasie).

Fra le prostaglandine, la PGE₂ è quella che agisce maggiormente sugli osteoblasti e sugli osteoclasti, per azione mediata da quest'ultimi.

Sugli osteoclasti prevale all'inizio un effetto inibitorio, mentre in un secondo tempo, si assiste ad uno stimolo alla proliferazione dei precursori e ad un aumento delle cellule in attività; sugli osteoblasti la PGE₂ a basse concentrazioni stimola le mitosi, l'attività della fosfatasi alcalina e della peptidasi e la sintesi delle componenti non collagene; a dosi più elevate inibisce la sintesi di collagene (29, 84).

Le principali citochine e fattori di crescita interessati in questa azione sono:

Interleuchina (IL)-1: L'IL-1 è una famiglia di citochine costituita da IL-1 IL-1 e dall'antagonista del recettore di IL-1, prodotta principalmente dai monociti. L'IL-1 è il tipico mediatore delle risposte di fase acuta ed ha numerosi effetti sui vari tessuti (41).

Questa citochina stimola il riassorbimento osseo attivando gli osteoclasti direttamente o tramite gli osteoblasti (131), reclutando i loro precursori mononucleati e favorendone la fusione con formazione di cellule plurinucleate (65, 147). E' stata descritta anche una attività di stimolo di questa citochina sugli osteoblasti e sulla produzione di componenti della matrice ossea (45, 55).

Interleuchina (IL)-6: E' una citochina con varie attività sul sistema immunitario (interviene nella differenziazione finale dei B linfociti in cellule che producono anticorpi), sull'emopoiesi (azione sui progenitori multipotenti in sinergismo con IL-3) nelle reazioni di fase acuta ed altre varie attività (71).

Nell'osso IL-6 è prodotta dagli osteoblasti in risposta al PTH, IL-1 ed 1,25 (OH)₂D₃ (48); essa determina la proliferazione dei precursori degli osteoclasti in cellule mature (74). In sistemi sperimentali (10) e nel mieloma multiplo l'IL-6 provoca distruzione ossea ed

ipercalcemia (96). Anche nella malattia di Paget cellule mononucleate ottenute da colture di tessuto osseo producono quantità eccessive di IL-6 (132).

Tumor necrosis factor (TNF)- α : Conosciuto in precedenza come “cachessina” perchè ritenuto responsabile dello stato di cachessia che si osserva nei portatori di infezioni croniche e nelle neoplasie, questa citochina determina, analogamente ad IL-1, i tipici effetti delle reazioni da fase acuta. Anch'essa è prodotta da cellule monocito-macrofagiche e da cellule NK (47). Il TNF- α sugli osteoclasti ha effetti simili all'IL-1: stimola la proliferazione di questo stipite cellulare da precursori a cellule mature ed induce quest'ultime a riassorbire l'osso (110); tale effetto potrebbe essere tuttavia indiretto e mediato dagli osteoblasti (149). Il TNF- α causa una ipercalcemia, analoga-mente ad IL-1 ed IL-6 (110).

Transforming growth factor (TGF)- β : E' un fattore di crescita che ha importanti funzioni nel rimodellamento osseo.

Il TGF- β , infatti, viene liberato durante il riassorbimento ad opera degli osteoclasti e si lega ad una specifica proteina che lo protegge dalla distruzione che avviene ai bassi valori di pH che si osservano nelle zone di riassorbimento scheletrico; questo fattore viene rilasciato ad una certa distanza dall'orletto striato e richiama gli osteoblasti in vicinanza, avendo, allo stesso tempo una attività inibitoria nei confronti degli osteoclasti. L'azione del TGF- β , in questo modello, è in grado di spiegare la conservazione dell'equilibrio fra osteodistruzione e neoformazione (111).

Nella figura 3 sono riassunte le azioni delle varie citochine su osteoclasti ed osteoblasti.

Insulin growth factor (IGF)-I: è il mediatore periferico dell'azione del GH. Avrebbe funzione di stimolo sulla replicazione dei preosteoblasti, incrementando così il numero di osteoblasti in grado di sintetizzare la matrice ossea (17).

β_2 Microglobulina: è una proteina di membrana del complesso maggiore di istocompatibilità; essa non costituirebbe un fattore di crescita in senso classico, ma modulerebbe il legame al recettore di altri fattori di crescita od ormoni (17).

Valutazione del rimodellamento OSSEO

Un'alterazione dell'equilibrio dei processi di riassorbimento osseo e di neoformazione si verifica in molte malattie ossee: allo scopo di valutare il rimodellamento scheletrico sono state approntate varie metodiche.

La modalità più attendibile di studio è rappresentata dalla biopsia ossea. Essa consiste nel prelievo con un apposito ago di un frammento osseo (di circa 4-6 cm x 20-30 mm) dalla cresta iliaca anteriore superiore. Quest'ultimo esaminato al microscopio rende possibile una stima dell'attività delle BMUs. L'uso di analizzatori di immagine collegati al microscopio permette una valutazione quantitativa degli elementi presenti. Lo studio del fronte di riassorbimento, tuttavia, presenta difficoltà nella stima delle cavità formatesi con il riassorbimento per la quale sono state proposte varie metodiche (28). Il fronte di osteoproduzione viene invece reso fluorescente tramite assunzione di tetracicline marcate ed è quindi esaminabile con l'apposito microscopio (46).

La biopsia ossea è inoltre utilizzabile a scopo diagnostico in varie altre malattie scheletriche, specialmente nelle neoplasie per valutare l'eventuale interessamento osseo.

Per la sua invasività, per la difficile valutazione del fronte di riassorbimento che richiede che l'esame sia eseguito da istomorfometristi esperti, la biopsia ossea non viene usata routinariamente nella valutazione del rimodellamento.

A questo scopo vengono utilizzate, invece, alcune indagini di laboratorio.

Esse devono valutare separatamente le due fasi del processo (osteoproduzione e riassorbimento) ed essere sensibili e specifiche. Il loro significato non consiste esclusivamente nello studio dell'attività della malattia, ma talora la loro concentrazione sierica od urinaria è utilizzata anche come fattore prognostico (ad es. in alcune neoplasie).

Gli indici utilizzati sono rappresentati o da enzimi di cellule coinvolte nel processo di rimodellamento o da componenti della matrice ossea neoformati o riassorbiti. Più precisamente vengono oggi valutati a livello sierico ed urinario attività enzimatiche degli

osteoclasti (fosfatasi acida tartrato resistente) e degli osteoblasti (fosfatasi alcalina) e dosati componenti della matrice ossea prodotti dagli osteoblasti (frammento C-terminale del procollagene I, osteocalcina) ed ottenuti dalla degradazione ad opera degli osteoclasti (idrossiprolinuria, piridinoline, galattosil-idrossilisina).

E' opportuno osservare infine come il dosaggio di fattori di regolazione del riassorbimento osseo (PTH, $1,25(OH)_2D_3$, alcune citochine) possano avere un significato nella valutazione indiretta di questo fenomeno. Tutti gli indici utilizzabili nella pratica clinica e che saranno esaminati in dettaglio sono indicati nella tabella 3.

| Indici di osteodistruzione | |
|--|--|
| Idrossiprolinuria | Fosfatasi acida tartrato resistente |
| Calciuria | Peptide C-terminale del collagene I a legami crociati (ICTP) |
| Piridinoline urinarie | Galattosil-idrossilisina |
| Indici di osteoproduzione | |
| Fosfatasi alcalina | Peptide C-terminale del procollagene I (PICP) |
| Osteocalcina | |
| Fattori agenti sul rimodellamento osseo | |
| Paratormone (PTH) | Calcitonina |
| $25OH D_3$ | $1,25(OH)_2D_3$ |
| Interleuchina-1 (IL-1) | Interleuchina-6 (IL-6) |

Tabella 3. Indici di rimodellamento osseo

Indici di neoformazione ossea

Fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina è un enzima in grado di scindere i legami fosforici in ambiente alcalino. Non è ben nota la sua precisa funzione nel corso dei processi metabolici dell'osso: è presente negli osteoblasti e determinerebbe la lisi del pirofosfato, inibitore fisiologico dell'ossificazione.

L'attività della fosfatasi alcalina, in realtà, dipende da un gruppo di isoenzimi (chimicamente costituiti da glicoproteine contenenti acido sialico) presenti in vari tessuti che differiscono fra loro per alcune modifiche post-trascrizionali in grado di conferire diverse caratteristiche chimico-fisiche. Sono attualmente noti sette isoenzimi di origine biliare, epatica, ossea, renale, placentare, intestinale, carcino-placentare, ai quali si aggiungono forme anomale costituite dalle macrofosfatasi (15). Sono attualmente conosciuti quattro diversi geni che codificano per gli isoenzimi della fosfatasi alcalina: intestinale, placentare, similplacentare ed epatico/renale/scheletrico (141, 160).

L'attività totale della fosfatasi alcalina è valutata in base alla capacità di idrolizzare il p-nitrofenilfosfato: essa è proporzionale alla quantità di p-nitrofenolo prodotto misurato con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm (15). Gli isoenzimi osseo ed epatico contribuiscono a tale attività in misura quasi analoga nell'adulto normale (38), mentre nel 25% dei soggetti, specialmente se di gruppo sanguigno B o 0 e secretori dell'antigene Lewis, è presente l'isoenzima intestinale (15).

Nella comune pratica clinica l'aumento della fosfatasi alcalina è causato da malattie epatobiliari o da patologie ossee: è pertanto necessario distinguerle. In caso di stasi biliare si osserva spesso un aumento degli altri indici di colestasi, cosa che non si verifica in presenza di malattie ossee. In altri casi è tuttavia importante avere a disposizione metodiche in grado di discriminare l'origine dei due isoenzimi.

Mediante elettroforesi (su acetato di cellulosa o gel di poliacrilamide) si osserva che l'isoenzima epatico normale migra nella zona

2, mentre quello osseo determina una banda larga diffusa nella zona 2-pre, causando difficoltà di scansione densitometrica per la sovrapposizione dei picchi (15). Ogni isoenzima della fosfatasi alcalina ha una diversa stabilità al calore: fra essi il più termolabile è quello di origine ossea. Poiché gli isoenzimi denaturano indipendentemente l'uno dall'altro, l'attività residua dipenderà dalla quantità di isoenzima presente nel mezzo e che ha resistito alla denaturazione. In base ad essa la quantità è espressione percentuale dell'attività totale (15). Il dosaggio con l'uso dell'inattivazione al calore, tuttavia, è estremamente sensibile e necessita di una notevole attenzione nell'esecuzione per ottenere risultati attendibili.

Recentemente, infine, sono stati sviluppati metodi immunochimici con anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi che si trovano sull'enzima di origine ossea con una cross-reattività inferiore al 3% (64). Essi sono attualmente le metodiche più valide di determinazione.

Osteocalcina

L'OC è una proteina estremamente specifica per l'osso in quanto prodotta praticamente solo dagli osteoblasti. Una quota di osteocalcina, dopo la secrezione, viene liberata in circolo dove è possibile dosarla. Il dosaggio viene tuttavia complicato dalla presenza in circolo di frammenti originati dalla molecola intera. La catena aminoacidica di questa proteina, infatti, subisce delle rotture nelle posizioni 5, 13, 19, 20, 25, 37, 43-44, dando origine a frammenti polipeptidici di minori dimensioni che si accumulano in circolo soprattutto in condizioni di grave insufficienza renale (clearance della creatinina < 20 ml/min) (58, 154). (Figura 4)

Fra essi notevole importanza ha il frammento 1-43 per la sua interazione con il dosaggio sierico dell'OC. La sua origine non è ben nota: mentre in precedenza si pensava che i tutti i frammenti venissero prodotti in seguito ad una distruzione della molecola di OC da parte degli osteoclasti nel corso del processo di riassorbimento scheletrico, oggi si pensa che essi abbiano una più varia origine. Alcuni originerebbero in seguito alla distruzione periferica in varie sedi compreso plasma e rene; il grande frammento 1-43 potrebbe essere addirittura secreto dallo stesso osteoblasta (50).

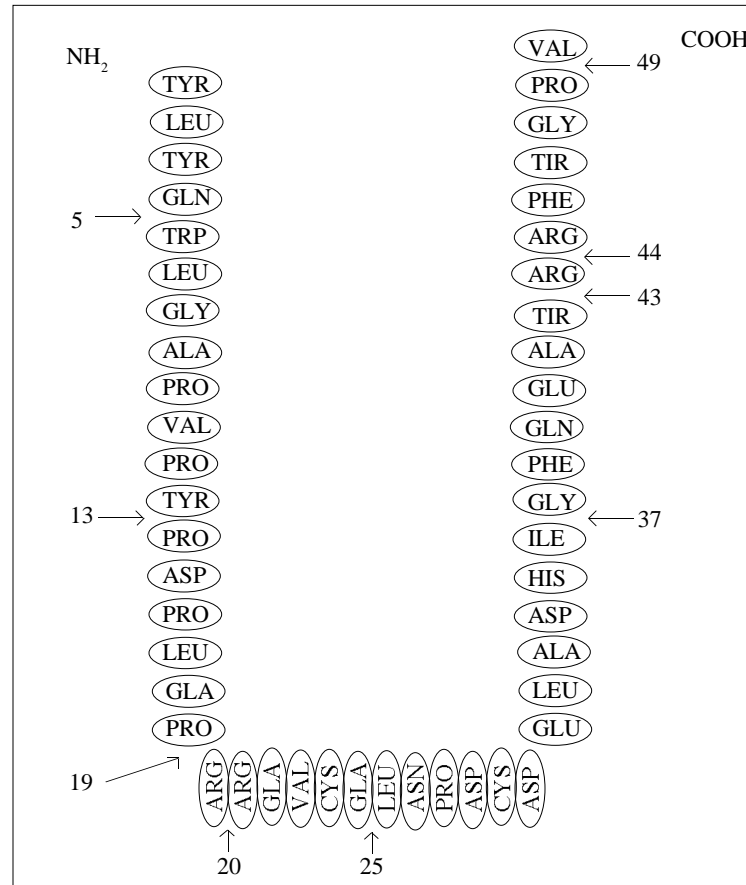


Figura 4. Struttura primaria dell'osteocalcina e punti di rottura della molecola che danno origine a frammenti circolanti.

Il dosaggio sierico dell'OC viene effettuato con varie metodiche immunometriche.

Mediante immunizzazione di conigli con OC bovina che differisce dalla forma umana per soli cinque aminoacidi e, pertanto, cross-reagisce con questa (122), sono stati ottenuti anticorpi policlonali diretti contro di essa. Con tali anticorpi è stata approntata una metodica RIA che è la prima e la più utilizzata. Utilizzando questi kit si osserva una cross reazione con i frammenti di OC soprattutto in condizioni di grave insufficienza renale. Per questi motivi è stata successivamente approntata un'altra metodica (IRMA) che utilizza questa volta un anticorpo monoclonale diretto contro la molecola di OC umana (153).

Anche con questa metodica, tuttavia, pur essendo stata eliminata l'interazione con i frammenti più piccoli, si osserva ancora la cross reazione (proprio perchè l'epitopo è in questa regione) con il grande frammento 1-43.

E' stata ora proposta una metodica IRMA in grado di dosare esclusivamente la molecola intera. Essa utilizza due anticorpi monoclonali di cui uno diretto contro la regione 43-49 (assente ovviamente nel frammento 1-43) e l'altro con funzioni di tracciante diretto verso la regione 5-13 (151).

Essa, tuttavia, necessita di una notevole precisione nell'esecuzione tecnica perchè esiste una notevole variabilità preanalitica; inoltre, per ora, non sono ancora a disposizione vaste casistiche che l'abbiano utilizzata. Allo stato attuale, pertanto, non esistono fondati motivi per preferire una metodica piuttosto di un'altra, eccezion fatta per i soggetti dializzati in cui è maggiore l'interazione con i frammenti.

I dati presenti in letteratura evidenziano come siano numerose le variazioni fisiologiche nei livelli sierici di OC.

L'OC è più bassa nei negri americani (il che peraltro è singolare in quanto essi hanno una densità ossea superiore ai bianchi) (8) e nei coreani (118). Essa presenta inoltre importanti correlazioni con il sesso e con l'età: l'OC aumenta durante la pubertà e sino alla terza decade (126, 127). Nella donna si osserva un'ulteriore elevazione del livello sierico durante la 5^a-6^a decade di vita: non è concorde se questo accada dopo i 45 anni (33, 150) o dopo i 50 (68). I valori assoluti di OC, comunque sono superiori nei soggetti di sesso maschile (73).

I livelli sierici di questa molecola osservano un ritmo circadiano con un picco fra la mezzanotte e le 4 del mattino ed un nadir fra le 10 e le 12 (57, 113). Alcuni autori, non confermati però da altri studi, hanno riscontrato significative modificazioni dei livelli sierici di OC durante le varie fasi del ciclo mestruale con valori più elevati in corrispondenza della fase luteale (98).

Anche i farmaci possono influenzare i valori di OC circolante: gli anticonvulsivanti ne riducono la sintesi (148) ed in corso di terapia steroidea si osserva una diminuzione dei livelli sierici correlata alla dose quotidiana assunta (38, 98, 124). Anche l'eccessiva assunzione di alcool per l'azione depressiva sugli osteoblasti può ridurre i valori (76).

Frammento C-terminale del procollagene I

Il dosaggio sierico di questo frammento, che origina dalle modificazioni post-trascrizionali del precursore del collagene I, caratteristico per l'osso, è un marcatore molto specifico dell'attività osteoblastica. Questo peptide, dopo essersi staccato dal procollagene I, viene stabilizzato mediante legami bisolforici intracatenari in una molecola (dosabile con metodica radioimmunologica) che viene secreta in quantità equimolecolare al collagene ed è per questo motivo un preciso marcatore di produzione ossea (152).

Attualmente è stata purificata la struttura antigenica ed approntata una metodica che ne permette l'uso su larga scala, a differenza di quella precedente che utilizzava un antigene di minor purezza e quindi era meno attendibile (93).

Il PICP è molto interessante perchè correla con la formazione ossea in molte malattie metaboliche (104).

Indici di riassorbimento osseo

Idrossiprolinuria

L'idrossiprolina è un aminoacido prodotto dalla degradazione delle molecole di collagene. Nell'organismo subisce una filtrazione a livello del glomerulo renale ed un riassorbimento per il 90% a livello dei tubuli; il fegato provvede a metabolizzarla ad urea ed anidride carbonica. Il 10% rimanente subisce una eliminazione renale. Comunemente viene dosata l'idrossiprolinuria totale che rappresenta quindi solo una piccola parte della quantità totale (38).

Il dosaggio viene eseguito dopo idrolisi acida di un campione di urine che è ossidato con cloramina-T e successivamente misurato con colorimetro (72).

Questa indagine, estremamente utilizzata, è tuttavia piuttosto aspecifica per le molte possibili interferenze.

Innanzitutto questo aminoacido è contenuto in tutti i tipi di collagene e non solo in quello di origine ossea: esso è tuttavia considerato generalmente di origine scheletrica perchè il turnover scheletrico è superiore a quello dei tessuti molli. Anche la dieta, se contenente in buona misura alimenti ricchi in collagene, può determinare falsi aumenti dell'idrossiprolina urinaria. Sono infine da considerare anche nella valutazione dei valori normali di questo parametro le dimensioni corporee e il valore del filtrato glomerulare (38). Proprio per evitare interferenze con gli alimenti ed i valori di filtrato renale sono stati proposti numerosi accorgimenti.

L'idrossiprolina può essere dosata sulle urine delle 24 ore dopo una apposita dieta contenente scarse quantità di collagene per evitare così le interferenze alimentari.

Questa metodica, tuttavia, si è rivelata di scarsa attendibilità e, pertanto, attualmente in molti casi è preferibile effettuare il dosaggio sulle urine delle prime due ore del mattino dopo un digiuno di 12 ore in modo da impedire le interferenze con l'alimentazione; i risultati sono poi corretti per la creatinina urinaria al fine di evitare errori dipendenti dai diversi valori del filtrato glomerulare. Il paragone fra i due tipi di metodica indica una maggiore utilità del test delle due ore nella valutazione del rimodellamento scheletrico in postmenopausa (115).

Calciuria

In seguito al riassorbimento osseo il calcio, principale costituente della componente minerale dello scheletro, viene liberato nel plasma: parte di esso è riutilizzato nella formazione di nuovo tessuto osseo, parte, invece, rimane libero ed è dosabile nelle urine quale indice di perdita ossea. Analogamente all'idrossiprolina, anche il calcio è dosato in rapporto alla creatinuria (per evitare le possibili influenze della funzionalità renale) sulle urine delle prime due ore del mattino. In questo modo è possibile ridurre, almeno entro certi limiti, l'interferenza dell'alimentazione sulla quantità di calcio presente nelle urine (46, 99).

Fosfatasi acida tartrato resistente

La capacità di scindere gli esteri fosforici in ambiente acido è posseduta da un gruppo di enzimi (fosfatasi acide) presenti in vari tessuti (prostata, pancreas, elementi circolanti del plasma, osteoclasti).

Nella valutazione di questa attività enzimatica bisogna distinguere l'enzima degli osteoclasti, indice di riassorbimento osseo, da quello degli altri organi. Allo scopo si utilizza la mancata inibizione dell'isoenzima di origine osteoclastica ad opera del tartrato di sodio; questa caratteristica è condivisa con la fosfatasi acida prodotta da altre cellule presenti in malattie rare (linfociti dell'hairy cell leukemia e monociti della malattia di Gaucher) e, pertanto, di scarsa importanza nella pratica quotidiana.

Il substrato comunemente utilizzato per la valutazione della attività della fosfatasi acida è l'alfa-naftil-fosfato; al substrato in esame si aggiunge tartrato di sodio che inibisce l'attività degli enzimi non di origine osteoclastica. Il risultato è letto contro standard con uno spettrofotometro a 405 nm (81).

Pur essendo questa una metodica piuttosto semplice esistono tuttavia problemi legati alla perdita di attività dell'enzima del 30% circa se il campione è conservato a temperatura ambiente per tre ore (125). E' possibile effettuare anche una separazione elettroforetica di questi isoenzimi ottenendo una serie di bande indicate con numeri da 0 a 5; la banda 5 è divisa in due bande più strette 5a e 5b, a

quest'ultima corrisponde l'attività enzimatica di origine osteoclastica (22).

I valori di fosfatasi acida tartrato resistente sono elevati nell'infanzia in seguito all'accrescimento scheletrico, diminuiscono nelle età successive per risalire nella donna in postmenopausa in seguito all'aumentato rimodellamento osseo (140).

Piridinoline

In seguito al riassorbimento osseo vengono liberate strutture piridinoliniche cicliche che, come si è detto, legano fra loro le molecole di collagene.

Attualmente è possibile dosare nelle urine il piridinolinio ed il desossipiridinolinio; quest'ultimo è presente solo nel tessuto osseo ed è, quindi, altamente specifico. Il vantaggio del dosaggio di queste molecole consiste nel fatto che esse non risentono delle influenze dietetiche.

Il dosaggio urinario viene eseguito con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) (60), oppure mediante metodica immunoenzimatica (130), su urine delle 24 ore, od in altre casistiche, su urine delle prime due ore del mattino (7). Mentre le prime metodiche HPLC prevedevano l'estrazione su cellulosa, è disponibile attualmente una analoga metodica dotata di colonne di cellulosa preimpaccate in cui non vi è la necessità dell'essiccazione. Tale kit sembra essere accurato, rapido e di facile esecuzione (14).

L'escrezione di queste molecole è superiore nell'infanzia (7); in postmenopausa si verifica un aumento di escrezione (156).

Frammento C-terminale del collagene I a legami crociati

Recentemente è stato introdotto un kit radioimmunologico per il dosaggio sierico di questo peptide a legami crociati che viene prodot-

to, analogamente alle piridinoline urinarie, in seguito alla distruzione del collagene ad opera degli osteoclasti durante il riassorbimento (42, 128).

Galattosil-idrossilisina

Anche l'idrossilisina, aminoacido specifico per il tessuto osseo, viene eliminato per via urinaria coniugato al galattosio. Esso è dosabile con metodica HPLC e può rappresentare un indicatore di riassorbimento scheletrico (94, 161)

Fattori di regolazione del rimodellamento osseo

Paratormone (PTH)

Il dosaggio del paratormone presenta alcuni problemi legati alla biologia della molecola. In circolo, infatti, non è presente soltanto la molecola intera (peptide costituito da 84 aminoacidi 1-84), ma anche frammenti originati da essa: sono noti due grandi frammenti 1-34 (N-terminale) e 35-84 (C-terminale); oltre a questi è possibile osservare una ulteriore degradazione in frammenti di minori dimensioni. Tale processo accade sia a livello delle paratiroidi che perifericamente.

La presenza dei frammenti e della loro importanza quantitativa a seconda della patologia interessata, spiega il motivo per cui sono state utilizzate varie metodiche per il dosaggio del PTH e nessuna sia di scelta in assoluto, ma ciascuna di esse possiede indicazioni diverse a seconda della patologia indagata.

Sono attualmente a disposizione metodiche RIA con anticorpi che riconoscono la regione medio-molecolare, C-terminale ed N-terminale. Recentemente sono stati elaborati dei kit IRMA con doppio anticorpo che riconoscono due diverse regioni (l'uno la porzione mediomolecolare o C-terminale e l'altro quella N-terminale) della molecola in esame (21, 41).

Calcitonina

La calcitonina (CT) viene prodotta a partire da un precursore, la pre-pro-calcitonina (14.000 di p.m.). All'estremità N-terminale è legato un peptide segnale ed un peptide detto Calcitonin related peptide (CRP); a quella C-terminale è presente un peptide (catalcina) ad attività ignota. In seguito a clivaggio enzimatico, per distacco si ottiene la pro-CT (p.m. 7000 dalton) in cui oltre alla calcitonina è

presente la catacalcina ed infine la molecola matura (p.m. 3500 dalton) La presenza di questi precursori è importante perchè danno origine a molecole immunoreattive che interferiscono con il dosaggio.

Quest'ultimo, pertanto, presenta numerosissimi problemi, che dipendono innanzitutto dalla instabilità del tracciante marcato, dalla scarsa sensibilità dell'antisiero, ma soprattutto dalla presenza in circolo di varie forme (i precursori, già citati, ed aggregati molecolari). Allo scopo di ottenere risultati attendibili sono state utilizzate varie metodiche. E' possibile impiegare kit RIA con anticorpo diretto contro varie parti della molecola (uno verso gli aminoacidi 1-17 che riconosce sia il monomero che precursori complessi ad elevato p.m. ed un altro diretto contro gli aminoacidi 26-32 che dosa la forma matura dell'ormone, sia monomericamente che polimerica); nel 40% dei soggetti, tuttavia, utilizzando questa metodica, l'ormone è indosabile. Anche il pretrattamento con estrazione della calcitonina endogena, o l'uso di metodiche IRMA non hanno migliorato molto la sensibilità del dosaggio. Attualmente la misurazione della calcitonina circolante viene utilizzata soprattutto nella diagnosi di carcinoma midollare della tiroide, neoplasia che presenta una notevole secrezione di questo ormone (21).

Metaboliti della vitamina D

Il dosaggio della vitamina D presenta scarso interesse pratico in quanto, essendo rapidamente trasformata, non fornisce utili indicazioni circa la sua reale disponibilità per le funzioni dell'organismo. Più importante invece il dosaggio del 25 OH D₃ e dell' 1,25 (OH)₂D₃ che rappresentano i suoi metaboliti.

Il 25 OH D₃, prodotto dell'idrossilazione epatica, è la forma di deposito circolante della vitamina D. L'1,25 (OH)₂D₃ è il metabolita attivo: è presente nel siero in quantità molto piccole. Questi due metaboliti sono in equilibrio dinamico fra loro: quando necessita l'azione di questa sostanza si ha il passaggio dalla forma deposito a quella attiva.

Il loro dosaggio viene effettuato con metodica radioimmunologica.

I livelli di 25 OH D₃ subiscono variazioni in base all'età con valori superiori nei giovani, rispetto agli anziani ed in rapporto alla stagio-

ne ed alla latitudine poichè il maggiore o minore irraggiamento solare determinano una variazione nella produzione di vitamina D.

La concentrazione sierica di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ presenta una notevole variabilità, anche nell'ambito della stessa giornata (21, 87).

Citochine

Il dosaggio delle citochine può essere effettuato su siero, ma è più opportuno che venga eseguito su sovranatanti di colture cellulari.

Dal sangue periferico si ottengono cellule mononucleate circolanti mediante centrifugazione di sangue eparinato su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque): da esse possono essere quindi isolati i monociti utilizzando la loro capacità di aderire ai supporti di plastica, mentre il restante è rappresentato per la quasi totalità da linfociti. Tali cellule possono essere quindi separatamente coltivate su piastre di Petri con apposito terreno, con o senza vari fattori di stimolo. Dai sovranatanti delle colture vengono effettuati, quindi, i dosaggi delle varie citochine con varie metodiche immunometriche, al fine di determinare la produzione di citochine da parte di cellule coinvolte nella loro sintesi (5).

Indagini di laboratorio delle principali malattie scheletriche

Verranno ora esaminate alcune importanti patologie scheletriche, nelle quali è stato utilizzato il dosaggio degli indici di rimodellamento osseo e dei fattori di regolazione esaminando i risultati della letteratura e, dove sono state effettuate, le nostre precedenti esperienze; per ciascuna malattia è presente una breve premessa patogenetica e l'utilizzo dei principali esami di laboratorio.

Osteoporosi

Generalità

L'osteoporosi è una malattia caratterizzata da una diminuzione della massa ossea con deterioramento della microarchitettura dell'osso e conseguente aumento del rischio di fratture (109). Essa deve essere distinta dall'osteopenia, condizione fisiologica nell'invecchiamento, in cui è soltanto ridotto il volume osseo e che si verifica in maniera armonica e senza aumento di eventi fratturativi.

L'osteoporosi è, come è noto, una patologia estremamente frequente: quasi un terzo delle donne di razza caucasica ultrasessantacinquenni presenta una o più fratture vertebrali. Anche in Italia l'incidenza è alta: l'1,16% delle donne fra i 50 e 54 anni va incontro a fratture femorali, mentre oltre gli 85 anni la percentuale sale al 16% con un costo annuo solo per la degenza di oltre 200 miliardi (90). Nella patogenesi dell'osteoporosi ha fondamentale importanza la perdita di tessuto scheletrico che si verifica dopo il raggiungimento del picco di massa ossea: una osteopenia molto marcata causa pertanto l'aumentato rischio di fratture.

Sono state individuate due modalità di perdita ossea: una cosiddetta "rapida", tipica della immediata postmenopausa e che interessa quindi solo le donne, ed una cosiddetta "lenta" che si verifica con l'avanzare dell'età e che colpisce entrambi i sessi. Questi due tipi di

diminuzione di massa ossea non devono essere intesi come fenomeni contrapposti, ma semplicemente due aspetti di uno stesso processo che si manifesta con modalità diverse a seconda dell'età.

Nell'**osteoporosi postmenopausale** è prevalente la perdita ossea rapida; essa corrisponde alla cosiddetta **osteoporosi di tipo I** i cui meccanismi patogenetici sono stati ipotizzati da Melton e Riggs (92).

Secondo tali autori, con la menopausa, in seguito alla caduta del tasso estrogenico, si vericherebbe una aumentata sensibilità del tessuto osseo all'azione del PTH, con conseguente innalzamento della calcemia e feed-back negativo sulla secrezione di PTH; inoltre la sintesi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si ridurrebbe con conseguente ipofunzione osteoblastica.

Attualmente, nella patogenesi dell'osteoporosi postmenopausale, si è anche sottolineata l'importanza di alcune citochine che potrebbero agire come mediatori locali della carenza estrogenica attivando il rimodellamento osseo.

Pacifici et al. hanno infatti dimostrato un aumento dell'attività di IL-1 da cellule mononucleate del sangue periferico in un gruppo di donne osteoporotiche con elevazione degli indici di formazione ossea (102); lo stesso gruppo ha osservato che la terapia estrogenica in postmenopausa riduce i livelli di IL-1 (103). In particolare aumenta l'IL-1 (134) che è la forma di IL-1 immessa in circolo dalle cellule.

Anche l'IL-6, a sua volta, è stata trovata innalzata in donne in climaterio sia in colture di osteoblasti che da monociti circolanti (5). Poiché il 17 estradiolo è in grado di inibire la produzione di IL-6 (54) questo potrebbe spiegare, a sua volta, il ruolo della carenza estrogenica nell'osteoporosi postmenopausale.

Gli effetti di questi fenomeni si osservano principalmente a carico dell'osso trabecolare (di cui sono particolarmente ricche le vertebre) che presenta il maggior rischio di frattura: istologicamente si verifica infatti la completa distruzione delle trabecole con aumento delle dimensioni delle cavità fra esse (106). Questo processo determina una veloce perdita ossea, in quanto gli osteoblasti non sono in grado di compensare questo rapido riassorbimento. Oltre allo squilibrio riassorbimento/neoformazione si può assistere ad un incremento del numero delle BMUs in attività con conseguente aumento del numero delle cavità (alto turnover osseo) (27).

Nell'**osteoporosi senile** od **osteoporosi di tipo II** il primo momento patogenetico sarebbe rappresentato da una diminuzione di attività dell'enzima $1,25$ idrossilasi con conseguenti ridotti livelli di

1,25 (OH)₂D₃ e diminuito assorbimento intestinale di calcio. In seguito a ciò, a scopo compensatorio, aumenterebbe il PTH con iperfunzione osteoclastica e conseguente perdita ossea. Dal punto di vista istologico è caratteristico di questa forma l'assottigliamento delle trabecole (106).(Figura 5)

Bisogna infine ricordare che esiste un gruppo di osteoporosi secondarie a farmaci ed a varie malattie che riconoscono vari meccanismi patogenetici, tutti però riconducibili ad una iperfunzione osteoclastica o ad una ipofunzione osteoblastica. (tabella 4)

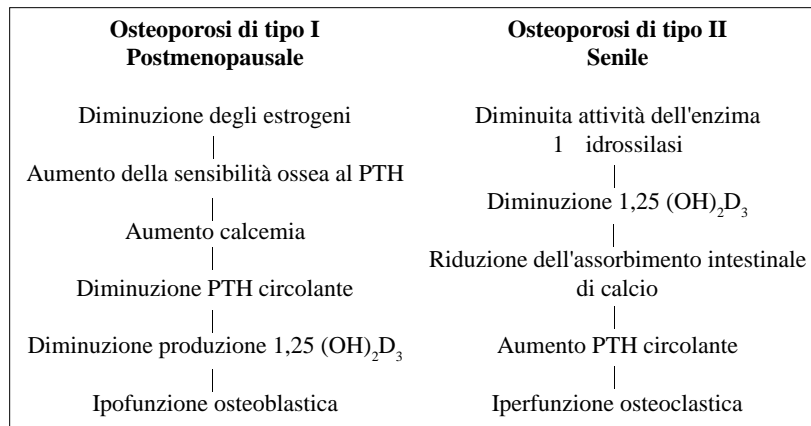


Figura 5. Patogenesi dell'osteoporosi.

Valutazione laboratoristica

Nella corretta valutazione delle donne osteoporotiche è necessario innanzitutto eseguire la misurazione della densità di massa ossea utilizzando varie metodiche mineralometriche di cui la più attendibile sembra essere oggi la mineralometria a raggi X (70). E' importante inoltre eseguire lo studio dei parametri di turnover osseo che devono indicarci l'attività della malattia ed, entro certi limiti, sono in grado di prevedere la futura perdita ossea.

Fra gli indici di osteoproduzione la **fosfatasi alcalina** è utilizzata da molto tempo. In questa patologia, tuttavia, la fosfatasi alcalina

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Malattie endocrine | |
| Ipogonadismo | Agenesia ovarica |
| Eccesso di glucocorticoidi | Ipertiroidismo |
| Iperparatiroidismo | Diabete Mellito |
| Malattie gastrointestinali | |
| Gastrectomia subtotale | Sindromi da malassorbimento |
| Ittero ostruttivo cronico | Cirrosi biliare primitiva |
| Grave malnutrizione | Alattasia |
| Disordini midollari | |
| Mieloma Multiplo | Mastocitosi sistemica |
| Carcinoma disseminato | |
| Malattie del connettivo | |
| Osteogenesi imperfetta | Omocistinuria |
| S. di Ehlers-Danlos | S. di Marfan |
| Cause varie | |
| Immobilizzazione | Broncopneumopatia cronica ostruttiva |
| Alcoolismo cronico | Artrite reumatoide (?) |
| Farmaci (Eparina, antiepilettici) | |

Tabella 4. Cause di osteoporosi secondaria.

non è un marcatore molto sensibile: generalmente i valori di questa attività enzimatica sono nei limiti della norma (49), e sono risultati al di sopra solo in pochi soggetti (33, 34, 66). Anche nella nostra esperienza non abbiamo osservato differenze statisticamente significative nei valori di fosfatasi alcalina fra un gruppo di donne osteoporotiche rispetto ad un altro comprendente donne in postmenopusa senza osteoporosi (136). Il dosaggio dell'isoenzima osseo in questo tipo di patologia è più sensibile e risulta aumentato in un maggior numero di soggetti (140).

Nella valutazione dell'attività osteoblastica delle donne osteoporotiche viene comunemente utilizzato oggi il dosaggio dell'**osteocalcina**. Negli studi effettuati sono stati in genere osservati valori elevati (13, 34, 69, 133, 158); altri autori, tuttavia, hanno segnalato concentrazioni sieriche di osteocalcina nei limiti della norma (56) o addirittura inferiori (18, 67, 155).

Il probabile motivo di queste differenze consiste nella presenza, nelle varie casistiche, di soggetti con diversi livelli di turnover osseo: l'osteocalcina è risultata inferiore negli studi effettuati con molti soggetti caratterizzati da un basso turnover osseo. La maggioranza degli studi citati in precedenza ha utilizzato kit con anticorpi policlonali contro osteocalcina bovina; noi abbiamo utilizzato, oltre ad esso, il kit monoclonale anti osteocalcina umana.

Utilizzando il kit policlonale abbiamo osservato significative differenze ($p < 0,01$) fra tre gruppi di donne (osteoporotiche vs donne in menopausa senza osteoporosi vs donne in premenopausa). Con il kit monoclonale, invece, utilizzando sempre questa suddivisione in tre gruppi soltanto i soggetti osteoporotici hanno dimostrato significative differenze nei confronti degli altri due (135). (Figura 6)

Alcuni autori sostengono che, nell'osteoporosi, debbano essere utilizzate metodiche con anticorpi policlonali (22).

Un altro marcatore utilizzato recentemente nella valutazione della formazione ossea è il **PICP**. I suoi livelli sierici sono inferiori nei soggetti osteoporotici (152) e correlano con il tasso di neoformazione ossea; la terapia con estrogeni ed androgeni ne riduce i livelli sierici (63). Le casistiche che lo hanno utilizzato sono tuttavia numericamente inferiori a quelle dell'osteocalcina e non forniscono risultati conclusivi.

Fra i marcatori di riassorbimento vengono comunemente impiegati il rapporto **idrossiprolinuria/creatininuria** e **calciuria/creatininuria** misurati sulle urine delle prime due ore del mattino secondo la metodica proposta da Nordin (99); nell'osteoporosi l'idrossiprolinuria è generalmente più elevata (115, 155). Nella nostra esperienza la calciuria è risultata più alta in misura statisticamente significativa in un gruppo di donne osteoporotiche rispetto ai controlli postmenopausali senza osteoporosi ($p < 0,05$). Nella stessa casistica non abbiamo osservato, invece, differenze per i valori di idrossiprolinuria (136).

Recentemente è stato proposto l'uso di altri e più recenti indici di riassorbimento sui quali, però l'esperienza è ancora limitata. Fra essi la **fosfatasi acida tartrato resistente** ha evidenziato livelli sierici che correlavano inversamente con la densità ossea (139).

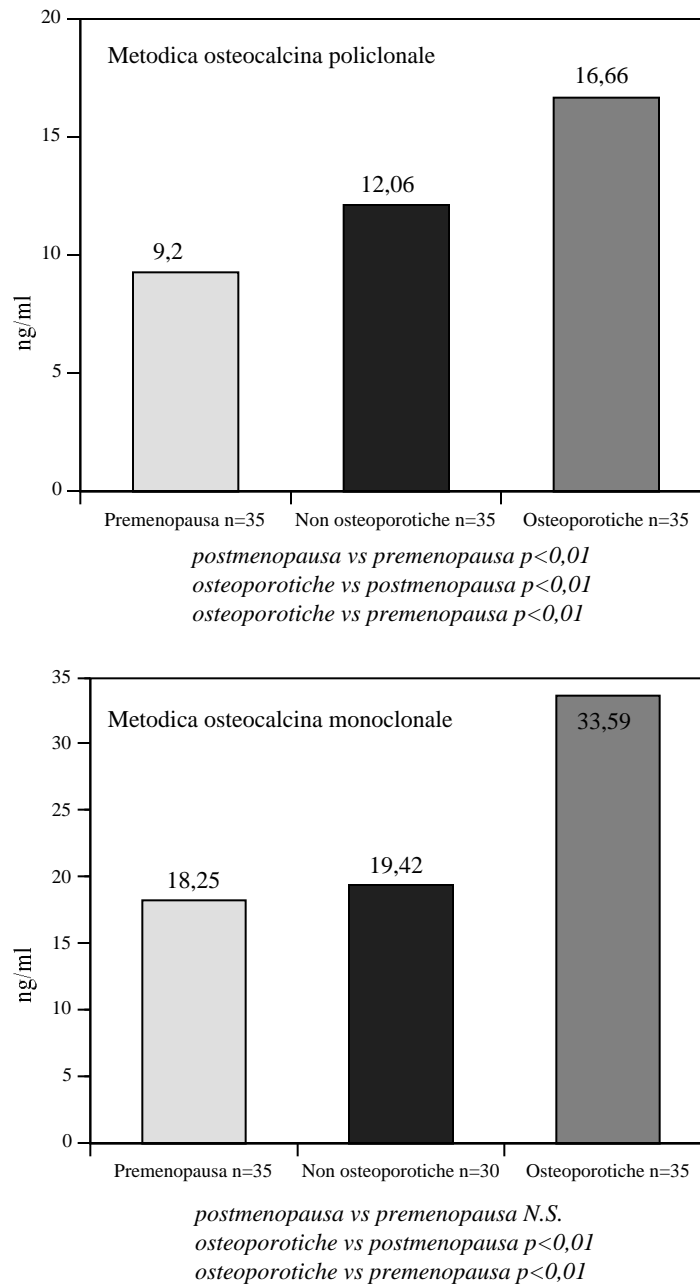


Figura 6. Osteocalcina nell'osteoporosi.

Sono stati utilizzati anche i dosaggi delle **piridinoline urinarie**, che, nell'osteoporosi, correlano con il riassorbimento scheletrico valutato con biopsia ossea e con indici di formazione quali l'osteocalcina (156, 157). In seguito a terapia estrogenica si osserva una diminuzione dei valori di piridinoline che risalgono all'interruzione del trattamento ormonale (156). Paragonati all'idrossiprolinuria, piridinolina ed idrossipiridinolina hanno dimostrato un più elevato potere di discriminazione. La stessa osservazione è stata effettuata per la **galattosil-idrossilisina** (9).

L'**ICTP** è stato dosato in donne con osteoporosi postmenopausale; i valori di questo marcatore risultavano elevati in maniera statisticamente significativa ($p < 0,012$) rispetto ad un gruppo di controllo (80).

Tutti questi marcatori sono utili nella valutazione dell'attività metabolica dell'osso: a partire da alcuni di essi, pertanto, sono stati elaborati dei modelli matematici in grado di individuare soggetti a turnover osseo elevato.

Christiansen et al. hanno utilizzato equazioni di regressione in cui comparivano alcuni semplici parametri clinici (altezza e peso) e laboratoristici (fosfatasi alcalina totale, osteocalcina, calciuria/creatininuria, idrossiprolinuria/creatininuria) per individuare soggetti a turnover elevato. In questo modello vi è una corrispondenza di circa l'80% fra i dati ottenuti in base ai parametri di laboratorio e la perdita ossea valutata con controlli mineralometrici seriati (24). E' stato anche introdotto dagli stessi autori un algoritmo diagnostico che permette di ottenere un risultato sovrapponibile alle equazioni di regressione (24, 62). E' a disposizione inoltre una metodica computerizzata che utilizza gli stessi parametri biochimici e che suddivide i soggetti in tre gruppi: alto turnover, basso turnover e soggetti borderline (46).

L'uso di queste metodiche, se confermato su casistiche ancora più ampie di quelle utilizzate per elaborarli, potrebbe essere molto utile per eseguire screening di massa.

I modelli matematici dovrebbero tenere conto anche dei più recenti parametri utilizzati nella valutazione del rimodellamento. Ad esempio è stato osservato che la combinazione dei valori di piridinolina, desossipiridinolina ed osteocalcina correla molto bene con la perdita ossea: tali indici, pertanto, potrebbero essere molto utili nella elaborazione di nuovi modelli matematici per la valutazione della perdita ossea (156).

E' opportuno, infine, accennare in breve ai risultati del dosaggio dei fattori circolanti che influenzano il metabolismo osseo.

Nei soggetti osteoporotici i valori di PTH sono in generale nei limiti della norma, la calcitonina è bassa ed anche i livelli di 1,25 (OH)₂D₃ sono spesso al di sotto della norma (86). Il significato di queste alterazioni non è tuttavia ancora ben chiaro.

Alcuni gruppi di ricerca hanno anche utilizzato il dosaggio di alcuni fattori locali nello studio di momenti patogenetici e della risposta alla terapia.

Il dosaggio della β₂ microglobulina è stato impiegato per valutare la risposta al trattamento: essa aumentava dopo terapia con anabolizzanti (androgeni) e diminuiva in seguito alla somministrazione di calcitonina indicando il verificarsi nel primo caso di un'azione di stimolo della neoformazione ossea (19).

Recentemente sono stati eseguiti dosaggi delle citochine ad azione sull'osso da sovrinatanti di colture di cellule mononucleate circolanti: nelle donne osteoporotiche, specie ad alto turnover, sono risultati elevati i valori dell'attività totale dell' IL-1 (102) che diminuivano dopo terapia estrogenica (103). L'aumento delle citochine nelle donne osteoporotiche sembra interessare l' IL-1 β (134) ed anche l' IL-6 (5, 114), anche se ciò non è stato confermato da altri autori. Il dosaggio delle citochine può essere, in prospettiva, anche utilizzabile quale indicatore di rimodellamento osseo. Questi fattori locali, infatti, possono essere anche più sensibili dei marcatori attualmente utilizzati.

In soggetti di sesso maschile con osteoporosi, infine, sono stati osservati bassi livelli sierici di IGF-1, con possibile significato patogenetico (85).

Osteodistrofia renale

Generalità

L'osteodistrofia renale è una frequente complicanza dell'insufficienza renale cronica in fase avanzata. Sono numerosi i fattori che concorrono alla sua patogenesi. La ridotta eliminazione di fosforo, innanzitutto, stimola la secrezione di PTH determinando un iperparatiroidismo secondario. La spiegazione classica consiste nell'alterazione del bilancio calcio/fosforo che determinerebbe

ipocalcemia e conseguente iperparatiroidismo secondario; attualmente si pensa invece che l'eccesso di fosfati agisca riducendo la produzione di $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$, forma attiva della vitamina D che viene prodotta a partire dal 25 OH D_3 ad opera dell'enzima $1\text{-}\alpha$ -idrossilasi presente nei mitocondri dei tubuli renali prossimali (75, 117). L' $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ avrebbe una funzione inibitoria sulla produzione di paratormone. Il PTH in eccesso pertanto aumenterebbe il turnover osseo sino ai classici quadri di osteite fibroso-cistica. Alla genesi dell'iperparatiroidismo concorre anche un allungamento della sua emivita per l'alterata funzione renale ed una alterata sensibilità del sensore per l'inibizione della secrezione (alterazione del "set point"). (12). In taluni casi, infine, si osserva la presenza di un adenoma delle paratiroidi che secerne PTH in maniera svincolata dal controllo omeostatico.

Il deficit di $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$, inoltre, determina un'importante alterazione nel processo di mineralizzazione del tessuto osteoide in quanto determina una riduzione dell'assorbimento del calcio intestinale causando, come è noto, osteomalacia. Bisogna tenere conto, infine, del carico di alluminio attualmente contenuto nei chelanti del fosforo che concorre con il deficit di $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ alla patogenesi dell'osteomalacia in quanto si accumula all'interno del fronte di osteoformazione impedendone la mineralizzazione. L'accumulo di questo elemento, inoltre, riduce il numero e l'attività degli osteoblasti (100).

Tutti questi fattori patogenetici concorrono a determinare le lesioni ossee. Si riconoscono due aspetti dell'osteodistrofia renale: una forma cosiddetta ad "alto turnover" (con iperattività osteoclastica) causata dall'iperparatiroidismo ed una a "basso turnover" determinata dalla carenza di $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ e dall'accumulo di alluminio. In molti casi, in realtà, si ha una coesistenza di questi due aspetti.

Valutazione laboratoristica

Nei pazienti uremici i livelli sierici di **fosfatasi alcalina** sono in genere elevati nei casi ad alto turnover e correlano con la severità dell'osteite fibrosocistica e con i livelli di PTH; concentrazioni elevate si osservano tuttavia anche in pazienti con osteomalacia. L'attività della fosfatasi alcalina può essere utilizzata anche per valutare la risposta alla terapia dell'osteomalacia con vitamina D.

Valori bassi si osservano invece nelle lesioni causate da un sovraccarico di alluminio.

Questa elevazione riguarda anche l'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina che, tuttavia, non viene utilizzato routinariamente in questo tipo di pazienti.

Il dosaggio dell'**osteocalcina** è importante nella valutazione dell'interessamento osseo negli uremici perchè rispecchia il turnover osseo valutato con biopsia (89). I livelli sierici di questo marcatore sono notevolmente superiori rispetto a quelli normali; ciò non dipende solo dall'aumento del metabolismo osseo, ma anche dalla ridotta eliminazione.

E' proprio nell'insufficienza renale in fase avanzata che il problema dei frammenti di osteocalcina diventa particolarmente importante.

Diversi studi, utilizzando la HPLC, hanno valutato la presenza di frammenti di OC nei pazienti uremici: mentre nei controlli normali si osservava un solo picco, nei soggetti con grave insufficienza renale si riscontravano picchi aggiuntivi dovuti ai frammenti (58, 154).

Ciò evidenzia i problemi del dosaggio dell'osteocalcina in questo tipo di soggetti; ciò è confermato effettuando il dosaggio di questa molecola con kit policlonale prima e dopo trattamento dialitico. Su 56 soggetti emodializzati sono state osservate, infatti, notevoli variazioni prima-dopo dei valori di osteocalcina: nel 58,92 % si è riscontrata una riduzione dei livelli di osteocalcina dopo dialisi, mentre nel 41,08% si è visto un aumento. Queste variazioni sono verosimilmente determinate dalla rimozione dei frammenti che si verifica con il trattamento emodialitico evidenziando come, a seconda dei frammenti di osteocalcina presenti in circolo e quindi a seconda delle interazioni con i vari anticorpi policlonali, il kit dia risultati molto diversi (77). Anche l'uso della metodica che utilizza un anticorpo monoclonale diretto contro la molecola umana in una casistica di 17 soggetti in emodialisi periodica ha ugualmente dimostrato variazioni prima e dopo il trattamento con una riduzione nel 63,15% dei soggetti ed un aumento nel 36,85% (77).

Al fine di evitare tale importante interazione in questi soggetti è stato utilizzato il kit con due anticorpi che dovrebbe essere assolutamente specifico per la molecola intera. Sono a disposizione dati preliminari che lo hanno utilizzato sia in fase predialitica (108) che dialitica (1): i valori ottenuti con quest'ultima metodica sembrerebbero correlare con il kit monoclonale. Altri dati dovranno però confermare l'utilità di questo kit nei dializzati anche perchè, come

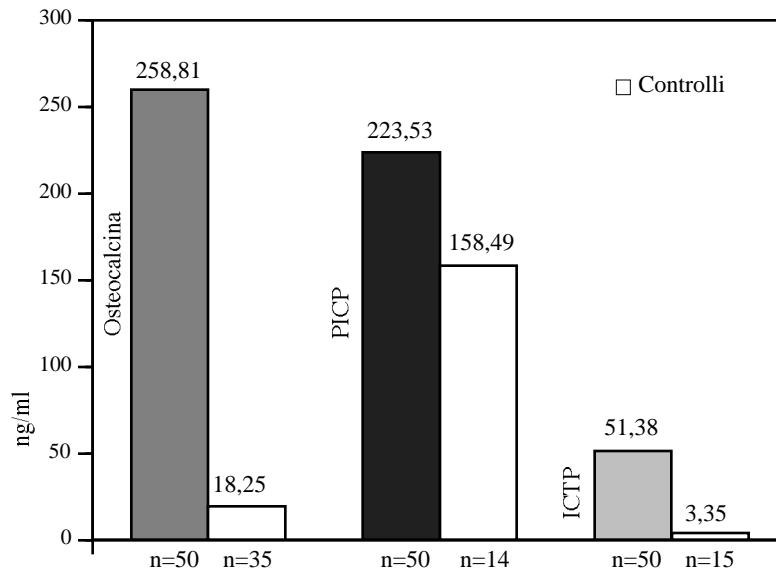


Figura 7. Indici di rimodellamento osseo nell'osteodistrofia renale.

accennato in precedenza, sembra esservi una notevole variabilità preanalitica. Attualmente è possibile utilizzare nei dializzati uno dei tre tipi di metodiche disponibili. Forse sono preferibili in questi soggetti le metodiche con anticorpo monoclonale, anche se questo non è assolutamente certo.

Fra i marcatori di neoformazione ossea è stato utilizzato anche il **PICP**; il suo livello sierico nei dializzati è risultato superiore alla norma (136). Il PICP correla nell'insufficienza renale con i parametri dinamici dell'osso ed è un utile indicatore della risposta al trattamento con 1,25 (OH)₂D₃ (25).

Fra gli indici di riassorbimento scheletrico non possono essere ovviamente impiegati nei dializzati i dosaggi urinari di calcio ed idrossiprolina; a questo scopo, sembra invece utile l'uso della determinazione dell'**ICTP** sierico che risulta elevato e che correla con il PTH, ma non con l'osteocalcina e il PICP. Ciò indicherebbe una dissociazione fra osteodistruzione e neoformazione ossea che rende ragione della necessità di utilizzare sia indici di neoformazione che di riassorbimento nella valutazione dei pazienti uremici (80). (Figura 7)

E' infine necessario accennare al dosaggio dei fattori che influenzano il rimodellamento osseo: il dosaggio del PTH è molto importante e i suoi livelli sierici possono aiutare nella distinzione fra forme ad alto e basso turnover (143). Per quanto riguarda la scelta della metodica di dosaggio del PTH, quella che valuta l'estremità N-terminale sembra essere la più utile per distinguere l'osteite fibrosa dall'osteomalacia (3).

Il dosaggio dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, infine, ha dimostrato livelli sierici bassi in questi pazienti, mentre sono stati osservati valori elevati di calcitonina.

Malattia di Paget

Generalità

La malattia di Paget dell'osso è una patologia ad eziopatogenesi ignota che si caratterizza istologicamente per l'alternanza disordinata di aree di osteodistruzione ed osteoproduzione conseguenti ad un rimodellamento osseo molto elevato. Colpisce soprattutto la pelvi, il rachide lombare e dorsale, i femori, il cranio e le tibie.

Si riconoscono tre fasi nell'evoluzione di questa patologia: in un primo momento si verifica un aumento del riassorbimento scheletrico in aree molto vascolarizzate (fase osteolitica), ad esso segue una fase in cui si deposita osso neoformato caratterizzato da una struttura disordinata con lamelle molto irregolari (fase mista). Si giunge, infine, ad una prevalenza di tessuto osseo compatto, anche se anomalo istologicamente, corrispondente ad una fase di "spegnimento" del processo morboso (fase sclerotica).

Valutazione laboratoristica

Lo studio radiologico tradizionale è fondamentale nella diagnosi della malattia.

La valutazione della sua attività, invece, si effettua classicamente con il dosaggio della fosfatasi alcalina totale che appare ancora oggi come la metodica più efficace ed economica. In numerosissimi casi, infatti, il sospetto di morbo di Paget si verifica quando in pazienti

asintomatici si osservano valori elevati di questo enzima. La conferma diagnostica si effettua ovviamente mediante studio radiologico tradizionale.

I livelli sierici di **osteocalcina**, invece, sono alti, ma percentualmente meno di quelli della fosfatasi alcalina (59); inoltre essa non sembra riflettere così accuratamente il rimodellamento scheletrico valutato con istomorfometria (35). Questo potrebbe dipendere da una rapida incorporazione nella matrice ossea dell'OC neosintetizzata o dei peptidi appena liberati dal riassorbimento oppure perché il rapporto fra la quantità di osteocalcina circolante e quella legata alla matrice è molto diversa rispetto al tessuto normale. In corso di trattamento, invece, l'osteocalcina diminuisce più rapidamente della fosfatasi alcalina e ciò sembra dipendere dalla più breve emivita della prima (31).

Fra i marcatori di riassorbimento quello più utilizzato è ancora oggi l'**idrossiprolinuria** misurata sulle urine delle 24 ore o su quelle del mattino. Essa è sufficientemente sensibile, specie nella valutazione delle forme poliostotiche. Nei pazienti con malattia di Paget è stata osservata una correlazione fra fosfatasi alcalina ed idrossiprolinuria (101): ciò dipende dalla stretta correlazione nella grande maggioranza dei casi fra riassorbimento e neoformazione ossea. Solo in taluni casi si assiste dopo adeguato trattamento ad una diminuzione dell'idrossiprolinuria che precede la riduzione della fosfatasi alcalina: ciò dimostra che il riassorbimento è il primo aspetto ad essere influenzato dalla terapia (159). L'utilizzo di altri indici di riassorbimento quali **piridinolina**, **desossipiridinolina** e **galattosil-idrossilisina**, elevati nel corso di questa malattia, non ha dimostrato vantaggi rispetto all'idrossiprolinuria (9).

Endocrinopatie

Generalità

Sono numerose le endocrinopatie che esercitano il loro influsso sul metabolismo osseo mediante l'azione degli ormoni sull'accrescimento ed il controllo del rimodellamento. In molte condizioni di iperfunzione, quindi, si ha un interessamento dello scheletro che può essere di maggiore o minore importanza a seconda dell'endocrino-

patia. Accenneremo in breve all'iperparatiroidismo, in cui viene coinvolto l'ormone principale della regolazione del metabolismo fosfocalcico ed all'ipertiroidismo, in cui l'eccesso di ormone tiroideo determina un più elevato riassorbimento scheletrico.

Nella maggior parte dei casi di ipofunzione, invece, non si osservano modificazioni del metabolismo osseo a meno che non si verifichino durante l'accrescimento.

Valutazione laboratoristica

Iperparatiroidismo: Nel corso dell'iperparatiroidismo si possono osservare elevazioni della concentrazione sierica di **fosfatasi alcalina** totale, sebbene in misura inferiore a quelle che si osservano nella malattia di Paget e dell' **osteocalcina** (155).

Ipertiroidismo: nella maggior parte di questi soggetti sono stati riportati valori elevati di **osteocalcina**; lo stesso si verifica nei pazienti con gozzo eutiroideo, in trattamento con ormoni tiroidei, in cui si verificava una perdita d'osso. Nelle donne in postmenopausa trattate con tiroxina per un gozzo, questo indice di rimodellamento osseo era più elevato rispetto a donne in postmenopausa senza patologia tiroidea (52, 88, 146).

Deficit di GH: i livelli di **osteocalcina** sono diminuiti in caso di deficit dell'ormone della crescita, ma aumentano in seguito alla somministrazione dell'ormone di sintesi. L'incremento di GH dopo tre mesi di terapia è un buon fattore predittivo in quanto correla alla risposta che si verificherà dopo un anno (11, 36).

Questi effetti sono confermati dall'osservazione sperimentale che il GH in colture cellulari induce la sintesi dell'osteocalcina (17). Nella valutazione dell'accrescimento viene utilizzato anche il **PICP**.

Neoplasie

Generalità

Le neoplasie primitive o metastatiche determinano un notevole interessamento del tessuto osseo.

Esse producono innanzitutto una serie di fattori umorali che agiscono sul rimodellamento scheletrico, fra cui soprattutto TNF- α e IL-1, IL-6 che attivano il riassorbimento locale osteoclastico. In seguito a tali fenomeni si verifica localmente una distruzione ossea, non compensata dalla neoformazione (osteolisi). Una certa quota di neoproduzione ossea attorno all'area litica si può però osservare in taluni casi, soprattutto in corso di metastasi da carcinoma prostatico e mammario: essa è dovuta in parte alla reazione locale, in parte ad una attivazione osteoblastica. Questo spiega i due caratteristici aspetti radiologici delle metastasi scheletriche che vengono distinte in osteolitiche ed osteoblastiche.

Nella maggior parte dei casi la presenza di localizzazioni ossee si verifica con normalità dei valori calcemici: ciò è dovuto ad una aumentata eliminazione di calcio da parte del rene che è adeguata alla quota mobilizzata in seguito alla distruzione ossea. Ipercalcemia è presente solo nei casi in cui non vi sia una sufficiente attività dell'emuntorio renale, ad esempio per la produzione di fattori simil-PTH che inibiscono la escrezione di calcio (95).

Anche nel mieloma multiplo, neoplasia B-linfocitaria, la distruzione ossea è determinata da un gruppo di fattori denominati Osteoclast Activating Factor (OAF) che sono rappresentati da IL-1, IL-6 e TNF- α prodotti in maniera autonoma dalle plasmacellule neoplastiche (95).

Valutazione laboratoristica

Metastasi ossee: lo studio delle lesioni tumorali ossee si esegue innanzitutto mediante radiologia tradizionale e non (TAC, NMR) ed utilizzando la scintigrafia con tecnezio- pirofosfato. Il laboratorio ha tuttavia l'importante funzione di monitorare i pazienti trattati per neoplasia primitiva evidenziando precocemente eventuali metastasi scheletriche e di fornire dati di significato prognostico e di risposta terapeutica in pazienti con malattia estesa all'osso.

Anche in questo caso sono stati utilizzati sia i marcatori di neoformazione ossea, per evidenziare l'eventuale produzione ossea locale, che di lisi.

Fra i primi è stata impiegata la **fosfatasi alcalina**: l'attività totale non sembra essere molto utile in quanto un suo aumento può dipendere anche da un interessamento epatico, frequente in molte neoplasie. E' preferibile pertanto utilizzare la determinazione dell'isoenzima osseo: impiegando il dosaggio di questo indice con anticorpo monoclonale in un gruppo di donne con metastasi ossee di carcinoma della mammella è stato osservato che il suo livello sierico era più elevato nei pazienti con metastasi scheletriche, rispetto a quello dei soggetti che ne erano privi e correlava con un altro marcatore tumorale (CA 549). L'uso di questo dosaggio è utile, ma non in caso di malattia localizzata (30).

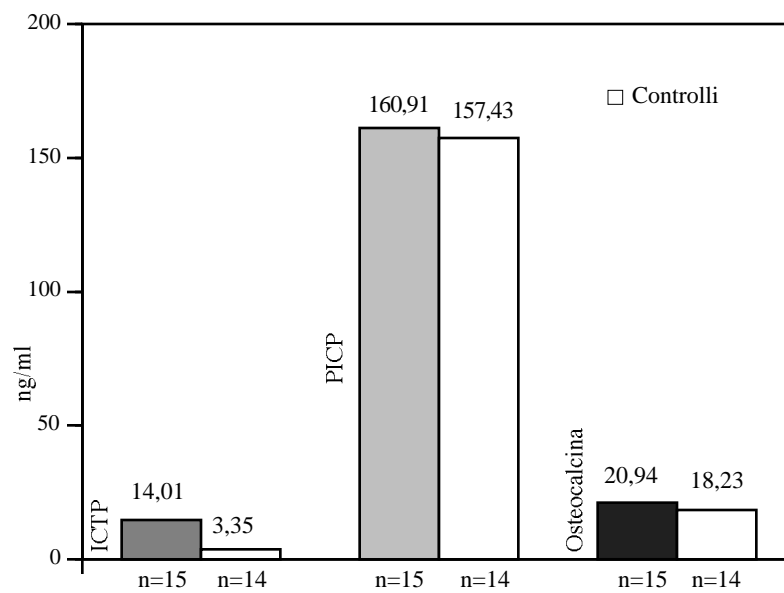
Anche l'**osteocalcina** è stata utilizzata nella valutazione dell'interessamento neoplastico scheletrico: nelle metastasi di carcinoma della mammella è stato infatti osservato un aumento dell'osteocalcina in una certa percentuale di soggetti (26, 112); come era prevedibile, l'incremento si verificava specialmente in caso di localizzazioni osteosclerotiche. La concentrazione sierica dell'osteocalcina si riduceva in caso di risposta al trattamento (26). Nelle localizzazioni ossee delle neoplasie della prostata sono stati ottenuti risultati contraddittori. (83, 142, 145, 151).

Nella valutazione del riassorbimento osseo è stata impiegata soprattutto l'**idrossiprolinuria**, pur con i grossi limiti che da sempre presenta. Recentemente è stato utilizzato l'**ICTP**, indice molto più specifico, che spesso è elevato in corso di metastasi scheletriche di varie neoplasie (79).

Mieloma multiplo: nello studio del mieloma multiplo, neoplasia diffusa allo scheletro, è fondamentale utilizzare un indice dell'estensione della malattia: a tale scopo l'**ICTP** è di notevole utilità in quanto correla con le lesioni osteolitiche (42, 78) ed è un utile indice prognostico: soggetti con valori elevati hanno una prognosi peggiore, mentre nei soggetti rispondenti presenta una diminuzione.

La neoproduzione ossea nel mieloma è notoriamente un fattore prognostico favorevole ed è stata studiata utilizzando il dosaggio dell'**osteocalcina** che, in una casistica, risultava elevata nel 21% dei casi: questi soggetti erano caratterizzati da un potenziale osteolitico minore e da un decorso più indolente della malattia. I pazienti con bassi valori di osteocalcina, invece, presentavano una malattia in fase

avanzata, estese osteolisi, ipercalcemia e ridotta sopravvivenza (6, 107). Nella nostra esperienza utilizzando quali indici l'osteocalcina ed il PICP, non abbiamo osservato nei pazienti con mieloma una neoproduzione ossea che differisse significativamente dal gruppo di controllo costituito da soggetti con gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS) (78). (Figura 8)



ICTP vs controlli p=0,012
PICP vs controlli N.S.
OC vs controlli N.S.

Figura 8. Indici di rimodellamento osseo nel mieloma multiplo.

Conclusioni

L'uso degli indici biochimici di rimodellamento osseo è attualmente fondamentale nello studio del metabolismo scheletrico, anche se non tutti i marcatori utilizzati hanno la stessa utilità e la stessa validazione clinica.

Fra gli indici di osteoproduzione il dosaggio della attività totale della fosfatasi alcalina è sicuramente il più semplice ed economico. Esso è ancora oggi di prima scelta nella valutazione dell'attività della malattia di Paget ove, come si è visto, l'uso di altri marcatori presenta solo un costo superiore senza particolari vantaggi; anche nello studio delle lesioni osteomalaciche esse può avere un importante significato.

In altre patologie (osteoporosi), per la sua scarsa sensibilità è di utilità limitata, anche se il suo dosaggio deve essere sempre eseguito per la diagnosi di eventuale associazione con la malattia di Paget o con l'osteomalacia. La valutazione dell'isoenzima osseo, oltre che per differenziare in molti casi l'iperfosfatemia alcalina di origine epatica ed ossea, potrebbe essere in futuro interessante nell'osteoporosi e nelle neoplasie ossee, in quanto molto più sensibile e specifico, ma, a tutt'oggi, non ci sono molti lavori al riguardo.

L'osteocalcina, a nostro giudizio, è attualmente l'indice più attendibile di osteoproduzione in condizioni quali l'osteoporosi, l'insufficienza renale e le endocrinopatie. Non è ben chiaro fra le metodiche in commercio quale sia quella da utilizzare. Un discreto interesse presenta il kit IRMA con doppio anticorpo che dosa la molecola intera di osteocalcina: è necessario tuttavia attendere casistiche più ampie che l'abbiano utilizzata in varie patologie; è tuttavia da tener presente che la variabilità preanalitica e la necessità quindi di particolari accorgimenti potrebbero limitare l'uso routinario della metodica a laboratori specializzati ed a particolari condizioni (insufficienza renale). Il PICP, non è a nostro giudizio, attualmente un marcatore di prima scelta nella valutazione della neoformazione ossea, ma può essere utile, accanto all'osteocalcina, quale ulteriore supporto. Fra i vecchi indici di riassorbimento scheletrico, idrossiprolinuria e calciuria non presentano grande utilità per la loro estrema variabilità e per le interferenze alimentari citate; unica eccezione è l'uso dell'idrossiprolinuria nella malattia di Paget ove, invece, è un buon indicatore.

L'interesse si è spostato, pertanto, verso le piridinoline e la galattosil-idrossilisina che, già nei primi lavori pubblicati, sembravano dimostrare buona attendibilità nel valutare il riassorbimento osseo in condizioni estremamente frequenti quali l'osteoporosi. Gli ultimi kit per il dosaggio di tali fattori, inoltre, sembrano essere di rapido e facile impiego. Interessante, a nostro giudizio, l'uso dell'ICTP, che ci pare un marcatore promettente. Questi più recenti marcatori potrebbero sostituire l'idrossiprolinuria nella valutazione del riassorbimento osseo nella maggior parte dei casi.

Il dosaggio dei fattori di regolazione del rimodellamento, invece, è limitato all'effettuazione della diagnosi differenziale fra le varie condizioni.

In alcuni casi di osteoporosi, infatti, è necessario eseguire il dosaggio ormonali per riconoscere una perdita secondaria ad endocrinopatie e al mieloma multiplo.

Si valutano pertanto il PTH, gli ormoni tiroidei (FT3, FT4, TSH), talora il cortisolo e si esegue elettroforesi delle proteine sieriche, immunoelettroforesi su siero e urine per la ricerca delle catene leggere.

La valutazione della calcitonina e dei metaboliti della vitamina D non presenta grande interesse pratico. Solo nell'osteodistrofia renale il dosaggio del PTH è di notevole importanza per valutare il contributo dell'iperparatiroidismo nella patogenesi della malattia.

Il dosaggio dei fattori locali di regolazione del rimodellamento, pur essendo, come si è detto, di possibile impiego nella valutazione del metabolismo scheletrico è per ora limitato alla ricerca.

Bisogna infine osservare come l'impiego dei marcatori di rimodellamento osseo sia di notevole interesse nel monitoraggio dei pazienti neoplastici, per valutare un interessamento scheletrico ed una risposta alla terapia; fino a pochi anni fa l'unica ad essere impiegato era l'idrossiprolinuria che, come si è ampiamente ripetuto, presenta una attendibilità piuttosto scarsa; attualmente sembrano promettenti i dosaggi dell'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina con anticorpo monoclonale e dell'ICTP.

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento alla sig. na Rita Pitotti per la sua preziosa collaborazione nella stesura del dattiloscritto e per la realizzazione delle figure.

Bibliografia

- 1) Aimo G., Cunazza M., Gabriele A. et al. Confronto di due metodiche IRMA con anticorpi monoclonali per il dosaggio dell'osteocalcina. SIBioC 93. Torino 28 settembre-1 ottobre 1993
- 2) Anderson R.E., Kemp J.W., Jee W.S., Woodbury D.M. Ion transporting ATPases and matrix mineralization in cultured osteoblast-like cells. *In vitro* 1984; 20: 837-846
- 3) Andress D.L., Endres D.B., Ott S.M. et al. Parathyroid hormone in aluminium bone disease: a comparison of parathyroid bone assays. *Kidney Int.* 1986; (suppl.18) 29: S87-S90
- 4) Arnaud C.D., Pun K.K. Metabolismo e dosaggio dell'ormone paratiroideo. In: Diagnostica di laboratorio nelle malattie metaboliche dello scheletro. 1992 Milano Promopharma; pagg. 19-56
- 5) Balleari E., Rosa F., Bason C. et al. Interleuchina 6 nell'osteoporosi postmenopausale. 30^o Congr. Naz. Soc. It. Reumatologia. Abano Terme 5-7 novembre 1993
- 6) Bataille R., Delmas P., Sany J. Serum bone gla protein in multiple myeloma. *Cancer* 1987; 59: 329-333
- 7) Bearsdworth L.J., Eyre R., Dickinson I.R. Changes with age in the urinary excretion of lysil and hydroxy lysylpyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J. Bone Min. Res.* 1990; 5: 671-675
- 8) Bell N.H., Greene A., Epstein S. et al. Evidence for alteration of vitamin D metabolism in blacks. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 470-473
- 9) Bettica P., Moro L., Robins S.P. et al. Bone-resorption markers Galactosyl-Hydroxylysine, Pyridinium cross-links and Hydroxyproline compared. *Clin. Chem.* 1992; 38: 2313-2318
- 10) Black K., Garrett I.R., Mundy G.R. Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well cachexia, leucocytosis and thrombocytosis in mice. *Endocrinology* 1991; 128: 2657-2659
- 11) Brixen K., Nielsen H.K., Flybjerg A., Mosekilde L. Recombinant human growth hormone treatment for one week stimulates

- osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J. Bone Miner. Res.* 1989; 4 (abstr.): 219
- 12) Brown E.M., Wilson R.E., Eastmen R.C. et al. Abnormal regulation of parathyroid hormone release by calcium in secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 54: 172-179
 - 13) Brown J.P., Delmas P.D., Malaval L. et al. Serum bone gla protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; 1091-1093
 - 14) Calabresi E., Lasagni L., De Feo M.L. et al. Dosaggio delle piridinoline urinarie con un nuovo kit in HPLC. SIBioC 93. Torino 28 settembre-1 ottobre 1993
 - 15) Caldini M., Tozzi P., Bandinelli R., Bianchi M.A. Isoenzimi. In: Pasquinelli F. Diagnostica e tecniche di laboratorio. Rosini Ed. Firenze 1985; pagg. 187-279
 - 16) Canalis E., Lian J.B. Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in periosteum and in periosteum-free calvariae. *Bone* 1988; 9:243-248
 - 17) Canalis E., Mc Carthy T., Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 277-281
 - 18) Canniggia A., Nuti R., Galli M. et al. Effect of a long term treatment with 1,25 dihydroxyvitamin D3 on osteocalcin in postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 1986; 38:328-332
 - 19) Cantatore F.P., Loperfido M.C., Mancini L., Carrozzo M. Effect of calcitonin or the anabolic steroid Decadurabolin on serum 2 microglobulin in osteoporotic postmenopausal women. *J.Rheumatol.* 1992; 19: 1753-1755
 - 20) Capurro S., Castellani M.P., Franzi A.T. Istologia. Edi Ermes Milano, 1978
 - 21) Cecchettin M. Diagnostica di laboratorio. In: Le osteoporosi. Polli E.E., Cecchettin M., Ortolani S. (eds) R.Cortina. Milano 1988; pagg. 143-159
 - 22) Cecchettin M., Pietrogrande V. Osteoporosi: mito e realtà. Cisalpino. Milano 1993
 - 23) Celeste A., Rosen V., Buecker J. et al. Isolation of the human gene for bone Gla-protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO* 1986; 5: 1885-1890

- 24) Christiansen C., Riis B.J., Rodbro P. Prediction of rapid bone loss in postmenopausal women. *Lancet* 1987; i 1105-8
- 25) Coen G., Mazzaferro S., Ballanti P. et al. Procollagen I terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure. *Am. J. Nephrol.* 1992; 12: 246-251
- 26) Coleman R., Mashiter G., Fogelman I. et al. Osteocalcin a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment. *Eur. J. Clin. Oncol.* 1988; 24: 1211-1215
- 27) Compston J.E. Osteoporosis. *Clin. Endocr.* 1990; 33: 653-682
- 28) Compston J.E., Croucher P.I. Histomorphometric assessment of trabecular bone remodelling in osteoporosis. *Bone and Min.* 1991; 14: 91-100
- 29) Conway H.H., Diez L.F., Raisz L.G. Effect of prostacyclins and prostaglandin E1 (PGE1) on bone resorption in the presence and absence of parathyroid hormone. *Calcif. Tissue Int.* 1986; 38: 130
- 30) Cooper E.H., Forbes M.A., Hancock A.K. et al. Serum bone alkaline phosphatase and CA 549 in breast cancer with bone metastases. *Biomed. & Pharmacoter.* 1992; 46: 31-36
- 31) Deftos L.J., Parthemore J.G., Price P.A. Changes in plasma bone Gla protein during treatment of bone disease. *Calcif. Tissue Int.* 1982; 34: 121-124
- 32) Deftos L.J. Bone protein and peptide assay in the diagnosis and management of skeletal diseases. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1143-1148
- 33) Delmas P.D., Wahner H.W., Mann K.G., Riggs B.L. Serum bone gla protein increases with aging in normal women: implications for the mechanism of age related bone loss. *J. Clin. Invest.* 1983; 71: 1316-1321
- 34) Delmas P.D., Wahner H.W., Mann K.G., Riggs B.L. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *J. Labor. Clin. Med.* 1983
- 35) Delmas P., Demiaux B., Malaval L. et al. Serum bone Gla-protein is not a sensitive marker of bone turnover in Paget's disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* 1986; 38: 60-61
- 36) Delmas P., Chatelain P., Malaval L., Bonne G. Serum bone Gla-protein in growth hormone deficient children. *J. Bone Miner. Res.* 1986; 1: 333

- 37) Delmas P., Damiaux B., Malaval L. et al. Serum bone gamma carboxyglutamic acid containing protein in primary hyperparathyroidism and in malignant hypercalcaemia. *Calcif. Tissue Int.* 1986; 77: 985-991
- 38) Delmas P.D. Markers biochimici del turnover osseo. In: Osteoporosi. Etiologia, diagnosi e terapia. Riggs B.L., Melton III L.J.(eds) New York, Raven Press 1987; pagg. 313-333
- 39) Delmas P.D., Schlemmer A., Gineyts E. et al. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6: 639-644
- 40) De Luca H.F. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *Faseb. J.* 1988; 2: 224-236
- 41) Dinarello C.A., Wolff S.M. Mechanisms of disease: role of interleukin-1 in disease. *N.Engl. J. Med.* 1993; 328: 106-113
- 42) Elomaa I., Virkkunen P., Risteli L., Risteli J. (1992) Serum concentration of the cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) is a useful prognostic indicator in multiple myeloma. *Br. J. Cancer* 66; 337
- 43) Eriksen E.F., Colvard D.S., Berg N.J. et al. Evidence of oestrogen receptors in normal osteoblast cells. *Science* 1988; 241: 84-86
- 44) Eriksen E.F., Kassem M. The cellular basis of bone remodeling. *Triangle* 1992; 31: 45-57
- 45) Evans D.B., Bunning R.A.D. The effects of recombinant human interleukin-1 beta on cellular proliferation and the production of prostaglandin E2, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 166: 208-216
- 46) Fantini F., Venegoni C., Gallazzi M., Parafioriti A. Osteoporosi: Guida illustrata di fisiopatologia e diagnosi. Torino, UTET 1992
- 47) Ferrarini M., Pistoia V. Linfocine. In: Dammacco F. Immunologia in Medicina. Milano. Edi Ermes 1988; pagg. 1422-1432
- 48) Feyen J.H.M., Elford P., Dipadova F., Trachsel U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J. Bone. Min. Res.* 1989; 4: 633-638

- 49) Foucault P., Foucault M.H., Kucharewicz B. et al. Interêt de l'étude des phosphatases alcalines totales et de l'isoenzyme osseuse dans une population de sujets atteints d'osteoporose. *Ann. Biol. Clin. Paris* 1991; 49: 477-481
- 50) Garnero P., Grimaux M., Borel O. et al. Immunoreactive forms of circulating human osteocalcin. 14th Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Minneapolis, USA September 30th- October 4th 1992
- 51) Garnero P., Grimaux M., Demiaux B. et al. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two site immunoradiometric assay. *J. Bone Min. Res.* 1992; 7: 1389-1398
- 52) Garrel D.R., Delmas P.D., Malaval L., Rourniaare J. Serum bone gla protein: a marker of bone turnover in hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 62:1052-1055
- 53) Gasser J.A., Jerome C.P. Parathyroid hormone: a cure for osteoporosis?. *Triangle* 1992; 31: 111-121
- 54) Girasole G., Jilka R.L., Passeri G. et al. 17 estradiol inhibits interleukin production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.* 1992, 89: 883-891.
- 55) Gowen M., Wood D.D., Russel R.G.G. et al. Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J.Clin. Invest.* 1985; 75: 1223-1229
- 56) Gundberg C., Aronoff J., Gallop P. The clinical usefulness of serum osteocalcin measurement. In: Butler W.T. ed. *The Chemistry and biology of mineralized tissue.* 1985 Birmingham: EBSCO Media; pagg. 411-415
- 57) Gundberg C., Makowitz M., Mizruchi M., Rosen J. Osteocalcin in human serum: a circadian Rhythm. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 1985; 60: 736-739
- 58) Gundberg C.M, Weinstein R.S. Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1762-1767
- 59) Gundberg C.M., Lian J.B., Gallop P.M., Steinberg J.J. Urinary gamma carboxyglutamic acid and serum osteocalcin as bone

- markers: studies in osteoporosis and Paget's diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987; 64: 1079-1082
- 60) Gunja-Smith Z., Boucek R.J. Collagen cross-linking compounds in human urine. *Biochem. J.* 1981; 197: 759-762
- 61) Hale J.E., Fraser J.D., Price P.A. The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 6579-6583
- 62) Hansen M.A., Overgard K., Riis B.J., Christiansen C. Ruolo del picco di massa ossea e della perdita ossea nell'osteoporosi postmenopausale: uno studio di dodici anni. *Br. Med. J. (ed. it.)* 1992; 16: 61-65
- 63) Hassager C., Jensen L.T., Johansen J.S. et al. The Carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in serum as marker of bone formation: the effect of nandrolone decanoate and female sex hormones. *Metabolism* 1991; 40: 205-208
- 64) Hill C.S., Wolfert R.L. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clin. Chem. Acta* 1989; 186: 315-320
- 65) Hughes D.E., Mac Donald B.R., Russell R.G.G. et al. Interleukin 1 stimulates the formation of osteoclast-like cells in long term human marrow cultures. *Br. J. Rheumatol.* 1988; 27 (suppl.2): 37
- 66) Hulth A.G., Nilsson B.E., Westlin N.E. Alkaline Phosphatase in women with osteoporosis. *Acta Med. Scand.* 1979; 206-211
- 67) Ismail F., Epstein S., Pacifici R. et al. Serum bone Gla protein (BPG) and others markers of bone mineral metabolism in postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 1986; 39: 230-233
- 68) Johansen J., Thomsen K., Christiansen C. Plasma bone Gla protein concentrations in healthy adults. Dependence on sex, age and glomerular filtration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1987; 47: 345-350
- 69) Johansen J., Riis B.J., Delmas P.D., Christiansen C. Plasma BPG: an indicator of spontaneous bone loss and of the effect of oestrogen treatment in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Invest.* 1988; 18: 191-195
- 70) Johnston C.C., Slemenda C.W., Melton L.J. Clinical use of Bone densitometry. *N. Engl. J. Med.* 1991; 16: 1105-1109

- 71) Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1-10
- 72) Kivirikko K.I., Laitinen O., Prockop D. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.* 1967; 17: 249-255
- 73) Koyama N., Ohara K., Yokota H. et al. A one step sandwich enzyme immunoassay for gamma carboxylated osteocalcin using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 1991; 139: 17-23
- 74) Kukita A., Bonewald L., Rosen O. et al. Osteoinductive factor (OIF) inhibits formation of human osteoclast like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 3023-3026
- 75) Kumar R. Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Physiol. Rev.* 1984; 64: 478-504
- 76) Laitinen K., Lamberg-Allardt C., Tunninen R. et al. Effects of moderate alcohol intake on bone and mineral metabolism in normal men. *Bone Miner.* 1991; 13: 139-151
- 77) Lanfranco E., Rosa F., Ebbli A. Diversi dosaggi dell'osteocalcina in pazienti dializzati. *Laboratorio*, 1993; 1-2: 6-10
- 78) Lanfranco E., Rosa F., Balleari E. et al. Markers biochimici di rimodellamento osseo nel mieloma multiplo. *XCIV Congr. Naz. Soc. It. Med. Interna. Roma* 14-18 ottobre 1993
- 79) Lanfranco E., Rosa F., Balleari E. et al. Cross-linked carboxyterminal telopeptide type I collagen (ICTP) in Multiple Myeloma (MM) and in bone metastasis. *XXIst Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM) Jerusalem* November 7-11, 1993
- 80) Lanfranco E., Rosa F., Balleari E. et al. Uso del dosaggio del peptide C-terminale del collagene I nella valutazione delle malattie dell'osso ad elevato turnover. *Clin. Labor.* 1993; 17: 205-208
- 81) Lau K.H.W., Onishi T., Werdegal J.E. et al. Characterization and assay of tartrate resistant acid phosphatase in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin. Chem.* 1987; 33: 458-462
- 82) Lemoullac J.M., Julienne A., Chenais J. et al. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Lett.* 1984; 167: 93-97
- 83) Lewenhaupt A., Ekman P., Eneroth P., Kalner A. On reference values for tumour markers in prostatic carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1988; 110: 119-123

- 84) Lerner U.H., Ransjo M., Ljunggren O. Prostaglandin E2 causes transient inhibition of bone mobilization matrix degradation and lysosomal enzyme release from mouse calvarial bone in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 1987; 40:323-331
- 85) Ljunghall S., Johansson A.G., Burman P. et al. Low plasma levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in male patients with idiopathic osteoporosis. *J. Intern. Med.* 1992; 232: 59-64
- 86) Lorè F., Nuti R., Vattimo A., Caniggia A. Vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *Horm. Metab. Res.* 1984; 16: 58
- 87) Lorè F. Significato clinico del dosaggio dei metaboliti della vitamina D nel siero. In: *Diagnostica di laboratorio nelle malattie metaboliche dello scheletro.* 1992 Milano Promopharma; pagg. 57-67
- 88) Lukert B.P., Higgins J.C., Stoskopf M.M. Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 62: 656-658
- 89) Malluche H., Faugere M.C., Fanti P., Price P. Plasma levels of bone Gla-protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int.* 1984; 26:869-874
- 90) Mazzuoli G.F., Gennari C., Passeri M. et al. Incidenza delle fratture del femore: un'esperienza italiana. In the XIth International Conference on Calcium Regulating Hormones. Abstract book. Florence April 24-29, 1992.
- 91) Mc Kenna M.J., Frame B. Hormonal influences on osteoporosis. *Am. J. Med.* 1987; 61:1987
- 92) Melton J.L. III, Riggs B.L. Considerazioni cliniche in: *Osteoporosi. Eziologia, diagnosi e terapia.* Riggs B.L., Melton III L.J(eds) Raven Press. New York 1987; pagg. 165-191.
- 93) Melkko J., Niemi S., Risteli L., Risteli J. Radioimmunoassay of the Carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin. Chem.* 1990; 36: 1328-1332
- 94) Moro L., Battista C., Modricky C. et al. High performance liquid chromatographic preparation of galactosyl-hydroxylysine, a specific bone collagen marker. *J. Chromatogr.* 1989; 490: 285
- 95) Mundy G.R. Pathophysiology of cancer-associated hypercalcemia. *Sem. Oncol.* 1990; 17(suppl.2): 10-15

- 96) Mundy G.R. Cytokines and local factors which affect osteoclast function. *Int. J. Cell Cloning* 1992; 10: 215-222
- 97) Nielsen H.K., Brixen K., Bouillon R., Mosekilde L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990; 70: 1431-1437
- 98) Nielsen H.K., Brixen K., Kassem M., Mosekilde L. Acute effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 plus prednisone on serum osteocalcin in normal individuals. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6: 435-441
- 99) Nordin B.E.C. Diagnostic procedures in disorders of calcium metabolism. *Clin. Endocrinol.* 1978; 6, 55-67
- 100) Norris K.C., Crooks P.W., Nebeker H.G. et al. Clinical and laboratory features of aluminium-related bone disease: differences between sporadic and "epidemic" forms of the syndrome. *Am. J. Kidney. Dis.* 1985; 6: 342-347
- 101) Nuti R. Malattie da guasti del metabolismo osseo. In: *Dizionario delle analisi e ricerche cliniche di uso corrente.* Coppo M. Gibertini P. (Eds) Piccin. Padova 1991; pagg. 746-775
- 102) Pacifici R., Rifas L. et al. Spontaneous release of interleukin 1 from human monocytes reflects bone formation in idiopathic osteoporosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1987; 84: 4616-4620.
- 103) Pacifici R., Rifas L., McCracken R. et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1985; 86: 2398-2402.
- 104) Parfitt A.M., Simon L.S., Villanueva A.R. et al. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* 1987; 2: 427-436
- 105) Parfitt A.M. Rimodellamento osseo: relazione tra la quantità e la struttura delle ossa e patogenesi e prevenzione delle fratture. In: *Osteoporosi. Eziologia, diagnosi e terapia.* Riggs B.L., Melton III L.J. (eds) Raven Press. New York. 1987; pagg. 49-101
- 106) Parfitt A.M. The two-stage concept of bone loss revisited. *Triangle* 1992; 31: 99-110
- 107) Pasquini E., Galieni P., Fattori P. et al. Dosaggio dell'osteocalcina sierica nei pazienti con mieloma multiplo. XXXII Congr. Naz. Soc. It. Ematol. Roma 8-12 ottobre 1989

- 108) Pecchio F., Guasti G.C., Roccatello D. et al. Il dosaggio della molecola intatta di osteocalcina nella insufficienza renale cronica in fase predialitica. SIBioC 93. Torino 28 settembre-1 ottobre 1993
- 109) Peck W.A., Woods W.L. Le cellule del tessuto osseo. In: Osteoporosi. Etiologia, diagnosi e terapia. Riggs B.L., Melton III L.J. (eds) Raven Press. New York 1987; pagg. 1-44
- 110) Pfeilschifter J., Chenu C., Bird A. et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J. Bone Min. Res.* 1989; 4: 113-118
- 111) Pfeilschifter J., Seyedin S.M., Mundy G.R. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 680
- 112) Pietschmann P., Zielinski C.H., Woloszczuk W. Serum osteocalcin levels in breast cancer patients. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 1989; 115: 456-458
- 113) Pietschmann P., Resch H., Woloszczuk W., Willvonseder R. A circadian rhythm of serum osteocalcin levels in postmenopausal osteoporosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1990; 20: 310-312
- 114) Pioli G., Basini G., Pedrazzoni M. Spontaneous release of interleukin 1 and interleukin 6 by peripheral blood mononuclear cells after oophorectomy. *Clin. Sci.* 1992; 83: 503-507
- 115) Podenphant J., Riis B.J., Larsen N.E., Christiansen C. Hydroxyproline/creatinine ratio estimates of bone resorption in early postmenopausal women. Fasting and 24-h urine samples compared. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1986; 46: 459-463
- 116) Podenphant J., Johansen J.S., Thomsen K. et al. Bone turnover in spinal osteoporosis. *J. Bone Min. Res.* 1987; 2: 497-503
- 117) Portale A.A., Booth B.E., Halloran B.P., Morris R.C. Jr. Effect of dietary phosphorus on circulating concentrations of 1,25 dihydroxyvitamin D and immunoreactive parathyroid hormone in children with moderate renal insufficiency. *J. Clin. Invest.* 1984; 73: 1580-1589
- 118) Power M.J., Fottrel P.F. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1991; 28: 287-335
- 119) Price P.A., Baukol S.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cell. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:11660-11663

- 120) Price P.A., Nishimoto S.K. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein and its discovery in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77: 2234-2238
- 121) Price P.A., Baukol S.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases serum levels of the vitamin K-dependent protein from human bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 99: 928-935
- 122) Price PA. Osteocalcin: bone and mineral research. Peck WA.(ed) Elsevier, Amsterdam. *Excerpta Med* 1983; 1: 157-168
- 123) Reginster J.Y., Franchimont P. Dosaggio radioimmunologico della calcitonina. In: *Diagnostica di laboratorio nelle malattie metaboliche dello scheletro*. 1992 Milano Promopharma; pagg. 7-18
- 124) Reid I.R., Chapman G.E., Fraser T.R.C. et al. Low serum osteocalcin levels in glucocorticoid- treated asthmatic. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 62: 379-383
- 125) Riccardino N., Viberti G. Il laboratorio nell'osteoporosi. I corso di Aggiornamento "Pino Rosso". Alba 27-29 febbraio 1992
- 126) Riis B.J., Krabbe S., Catherwood B.D. et al. Bone turnover in male puberty determined by serum BGP. *Calcif. Tissue Int.* 1985; 37: 213-217
- 127) Riis B.J., Krabbe S., Christiansen C. et al. Bone turnover in male puberty. A longitudinal study. *Calcif.Tissue Int.* 1990; 50: 649-655
- 128) Risteli J., Niemi S., Elomaa I., Risteli L. Bone resorption assay based on a peptide liberated during type I collagen degradation. *J. Bone Min. Res.* 1991; 6 (suppl.I): S251
- 129) Ritter N.M., Farach-Carson M.C., Butler W.T. Evidence for the formation of a complex between Osteopontin and Osteocalcin. *J. Bone Min. Res.* 1992; 7: 877-885
- 130) Robin S.P. An enzyme -linked immunoassay for the collagen cross-link pyridinoline. *Biochem. J.* 1982;207: 617-620
- 131) Rodan S.B., Wesolowski G., Chin J. et al. IL-1 binds to high affinity receptors on human osteosarcoma cells and potentiates prostaglandin E2 stimulation of cAMP production. *J. Immunol.* 1990; 145: 1231-1237
- 132) Roodman G.D., Kurihara N., Ohsari Y. et al. Interleukin 6 is a potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J.Clin. Invest.* 1992; 89: 46-52

- 133) Rosa F., Lanfranco E. Dosaggio dell'osteocalcina in pazienti con osteoporosi postmenopausale. In: I Corso di aggiornamento "Pino Rosso". Alba 27-29 febbraio 1992; pagg. 315-316
- 134) Rosa F., Balleari E., Lanfranco E. et al. Produzione di citochine nell'osteoporosi postmenopausale. 13^o Congr. Naz. Soc. It. Immunologia e Immunopatologia Roma 12-15 dicembre 1993
- 135) Rosa F., Lanfranco E., Balleari E. et al. Uso dell'osteocalcina nella valutazione del rimodellamento osseo. *Giorn. Clin. Med.* 1993; 74: 225-232
- 136) Rosa F., Lanfranco E., Bason C. et al. Uso dei moderni indici biochimici di rimodellamento osseo. Congr. Naz. Soc. It. Medicina Generale. Firenze 18-20 novembre 1993; pagg 43-48
- 137) Rosa F., Lanfranco E., Bason C. et al. Citochine ed indici di rimodellamento osseo nell'osteoporosi. 30^o Congr. Naz. Soc. It. Reumatologia. Abano Terme 5-7 novembre 1993
- 138) Santi I., Monti M., Giavelli S. et al. I marcatori biochimici di turnover osseo in una casistica di donne anziane, istituzionalizzate, affette da osteoporosi. *Giorn. Geront.* 1992; 40: 7-12
- 139) Scarnecchia L., Minisola S., Pacitti M.T. et al. Clinical usefulness of serum tartrate resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand. J. Clin. Invest.* 1991; 51: 517-524
- 140) Schiele F., Artur Y., Floc'h A., Siest G. Total, tartrate resistant and tartrate inhibited acid phosphatases in serum: biological variations and reference limits. *Clin. Chem* 1988; 34: 685-690
- 141) Seargent L.E., Stinson R.A. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature* 1979; 281: 152-154
- 142) Shih W.J., Wierzbinski B., Collinds J. et al. Serum osteocalcin measurements in prostate carcinoma patients with skeletal deposits shown by bone scintigram: comparison with serum PSA/PAP measurements. *J. Nuclear. Med.* 1990; 31: 1486-1489
- 143) Slatopolsky E. The interaction of parathyroid hormone and aluminium in renal osteodystrophy. *Kidney Int.* 1987; 31: 842-854
- 144) Stenner D.D., Tracy R.P., Riggs B.L., Mann K.G. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 6892-6896

- 145) Stracke H., Schatz C., Pralle H. et al. Osteocalcin, a marker in diseases with elevated bone metabolism. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1985; 110:1142-1146
- 146) Taelmann P., Kaufman J.M., Janssens X. et al. Reduced forearm bone mineral content and biochemical evidence of increased bone turnover in women with euthyroid goitre treated with thyroid hormone. *Clin. Endocrinol.* 1990; 33:107-117
- 147) Takahashi N., Mundy G.R., Roodman G.D. Recombinant human interferon-gamma inhibits formation of human osteoclast-like cells. *J. Immunol.* 1986, 137: 3544-3549
- 148) Takeshita N., Seino Y., Ishida H. et al. Increased circulation levels of γ -carboxyglutamic acid-containing protein and decreased bone mass in children on anticonvulsant therapy. *Calcif. Tissue Int.* 1989; 44: 80-85
- 149) Taonson B.H., Mundy G.R., Chambers T.J. Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol* 1987; 138: 775-779
- 150) Tarallo P., Henny B., Fournier B., Siest G. Plasma osteocalcin: biological variations and reference limits. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1990; 50: 649-655
- 151) Tarle M., Kovacic K., Strelkov-Alfirevic A. Correlation between bone scans and serum levels of osteocalcin, prostate-specific antigen, and prostatic acid phosphatase in monitoring patients with disseminated cancer of the prostate. *The prostate* 1989; 15: 211-219
- 152) Taubman M.B., Kammermann S., Goldberg B. Radioimmunoassay for human procollagen. *Science* 1974; 186: 115-118
- 153) Taylor A.K., Linkhart S.G., Mohon S. et al. Development of a new radioimmunoassay for human osteocalcin: evidence for a midmolecule epitope. *Metabolism* 1988; 37: 872-877
- 154) Taylor A.K., Linkhart S., Mohan S. et al. Multiple osteocalcin fragments in human urine and serum as detected by a midmolecule osteocalcin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990; 70: 467-472
- 155) Torres R., De La Piedra C., Rapado A. Osteocalcin and bone remodelling in Paget's disease of bone, primary hyperpa-

- rathyroidism, hypercalcaemia of malignancy and involutional osteoporosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1989; 49: 279-285
- 156) Uebelhart D., Gineyts E., Chapuy M.C. et al. Urinary excretion of pyridinium cross-links: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner.* 1990; 8: 87-96
- 157) Uebelhart D., Schlemmer A., Johansen J.S. et al. Effects on menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J. Endocrinol. Metab.* 1991 367-373
- 158) Yasumura S., Aloia J.F., Gundberg C.M. et al. Serum osteocalcin and total body calcium in normal pre- and postmenopausal women and postmenopausal osteoporotic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987; 64: 681-685
- 159) Yates A.J. Paget disease's of bone. In: Baillière's. *Clinical Endocrinology and metabolism* Martin T.J. (ed) London Baillière Tindall 1988 pagg. 267-285
- 160) Weiss M.J., Henthorn P.S., Lafferty M.A. et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 7182-7186
- 161) Zolezzi C., Pratelli L., Pasquini G. et al. Galattosilidrossilisina: determinazione in HPLC. *SIBioC* 93. Torino 28 settembre-1 ottobre 1993

Indice

| | | |
|--|------|----|
| Editoriale..... | pag. | 3 |
| Introduzione | » | 5 |
| Il tessuto osseo | » | 5 |
| Struttura dell'osso..... | » | 11 |
| Modellamento e rimodellamento osseo | » | 12 |
| Regolazione del rimodellamento..... | » | 14 |
| Valutazione del rimodellamento osseo | » | 19 |
| Indici di neoformazione ossea | » | 21 |
| Fosfatasi alcalina | » | 21 |
| Osteocalcina | » | 22 |
| Frammento C-terminale del procollagene I | » | 25 |
| Indici di riassorbimento osseo | » | 26 |
| Idrossiprolinuria | » | 26 |
| Calciuria | » | 27 |
| Fosfatasi acida tartrato resistente | » | 27 |
| Piridinoline..... | » | 28 |
| Frammento C-terminale del collagene I a legami crociati | » | 28 |
| Galattosil-idrossilisina..... | » | 29 |
| Fattori di regolazione del rimodellamento osseo..... | » | 30 |
| Paratormone (PTH)..... | » | 30 |
| Calcitonina | » | 30 |
| Metaboliti della vitamina D..... | » | 31 |
| Citochine..... | » | 32 |
| Indagini di laboratorio delle principali malattie scheletriche | » | 33 |
| Osteoporosi | » | 33 |
| Generalità | » | 33 |
| Valutazione laboratoristica | » | 35 |
| Osteodistrofia renale..... | » | 40 |
| Generalità | » | 40 |
| Valutazione laboratoristica | » | 41 |

| | | |
|-----------------------------------|---|----|
| Malattia di Paget | » | 44 |
| Generalità | » | 44 |
| Valutazione laboratoristica | » | 44 |
| Endocrinopatie | » | 45 |
| Generalità | » | 45 |
| Valutazione laboratoristica | » | 46 |
| Neoplasie..... | » | 47 |
| Generalità | » | 47 |
| Valutazione laboratoristica | » | 47 |
| Conclusioni..... | » | 50 |
| Bibliografia..... | » | 52 |
| Indice | » | 66 |



Come procedere per abbonarsi alla rivista
Journal of Preventive Medicine and Hygiene

Compilare il coupon, versare l'importo sul conto corrente postale n°28767168, e trasmettere via fax alla Medical Systems S.p.A ad uno dei seguente numeri: 010 809070; 010 8301403, sia la copia del coupon che la copia della ricevuta di c/c postale. Il vostro ordine sarà evaso entro 7 giorni dal ricevimento.

Compilare il coupon, allegare assegno circolare bancario "non trasferibile" intestato alla Amministrazione Medical Systems S.p.A e spedire il tutto per raccomandata. Il vostro ordine sarà evaso entro 7 giorni dal ricevimento.

Cognome Nome

Istituto

Via N. Tel.

C.a.p. Città Prov.

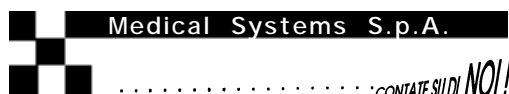
Fattura SI NO P.IVA

La causale di versamento va sempre indirizzata a:
Medical Systems S.p.A, Via Rio Torbido 40, Genova

Scelgo la seguente formula di pagamento:

Allego assegno di £. 75.000
Allego ricevuta di versamento di £. 75.000 sul cc/postale n°28767168

Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana



1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna, Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.

13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La b-endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.

27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno

- '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
 29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
 30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
 31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
 32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
 33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
 34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
 35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
 36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
 37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
 38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
 39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
 40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
 41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
 42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
 43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
 44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
 45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
 46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
 47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
 48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
 49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
 50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
 51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
 52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
 53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
 54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
 55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
 56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
 57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
 58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
 59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.

60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterinina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Iperensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.

Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!!

*Abbiamo una esperienza ultradecennnale.
Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo,
albanese...*

*Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle
Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla
Confederazione degli Stati Indipendenti.*



Editor in Chief: Dott. Sergio Rassu

Via Pietro Nenni, 6

07100 Sassari

Tel. e Fax 079 270464

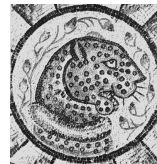
Amministrato: Medical Systems S.p.A.

Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 803498- 809070.



EDITORE

*Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza,
la nostra passione, le nostre tecnologie
per la pubblicazione di Atti di Congressi,
per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la
pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e
stampa di articoli scientifici.....*

Consultateci!!!!!!

Rosa F., Lanfranco E.,
Balleari E., Massa G., Ghio R.

Marcatori biochimici del
rimodellamento osseo



Direttore Responsabile

Sergio Rasso
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464

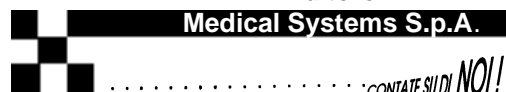
Responsabile Commerciale

Alessandra Pater

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 12, numero 88



Editore



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Español,
Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, Tribuna Biologica
e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ALGRAPHY S.n.c.
Passo Ponte Carrega, 62 R. - Genova
tel. 010/866272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Aprile 1994
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento
professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR
627/78)

**PERDITA DI
MASSA OSSEA ?**

- Dosaggio Monoclonale della
Desossipiridinolina libera
su campioni urinari
- Formato ELISA in
microstrips
- Risultati in 3 ore
- Altamente specifico per
riassorbimento osseo

PYRILINKS-D

MEDICAL SYSTEMS S.p.A.

..... IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO