

Značaj određivanja koštanih biomarkera u proceni rizika od fraktura i praćenju terapije kod pacijenata sa osteoporozom

**Andelka Milić¹, Milena Đurić¹, Gordana Gajić¹, Milan Mitrović¹,
Ljiljana Urošević¹, Veljko Jovanović¹, Budimir Ješić¹,
Radmila Kovačević¹, Jelena Vekić^{2*}, Aleksandra Zeljković²,
Aleksandra Stefanović², Ana Ninić², Vesna Spasojević-Kalimanovska²**

¹Institut za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica”, Beograd, Srbija;

²Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

* Autor za korespondenciju: Jelena Vekić

Tel. + 381 11 3951 266; e-mail: jelena.vekić@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Osteoporoza se karakteriše smanjenom mineralnom gustinom kostiju, što povećava fragilnost kostiju i rizik za nastanak fraktura. U ovoj studiji pratili smo 48 pacijentkinja sa osteoporozom tokom tri meseca sa ciljem da utvrdimo značaj određivanja koštanih biomarkera u proceni rizika od fraktura i praćenju terapije osteoporoze. Tokom trajanja studije 32 pacijentkinje su bile na antiresorptivnoj, a 16 na anaboličkoj terapiji. Svim pacijentkinjama odredili smo aktivnost alkalne fosfataze (ALP) i koncentracije osteokalcina, C-terminalnog telopeptida kolagena tip I i vitamina D u serumu pre i tri meseca nakon uvođenja terapije. Sa povećanjem nivoa osteokalcina i ALP rastao je rizik za smanjenje mineralne gustine kostiju (BMD). Antiresorptivna terapija dovela je do značajnog smanjenja koncentracija C-terminalnog telopeptida ($P<0,001$) i osteokalcina ($P<0,001$). Tokom anaboličke terapije nivo osteokalcina je značajno porastao ($P<0,01$). Na početku studije 25,5% pacijentkinja je imalo optimalne koncentracije 25(OH)D u serumu, a tešku deficijenciju 17% žena. Nakon 3 meseca suplementacije većina je poboljšala status vitamina D ($P<0,001$). Naši rezultati ukazuju da određivanje osteokalcina i C-terminalnog telopeptida može biti korisno za predviđanje rizika za smanjenje BMD i praćenje efekata terapije osteoporoze. Takođe, potvrđena je važnost određivanja koncentracije 25(OH)D za procenu statusa vitamina D u osteoporozi, u cilju otkrivanja pacijenata sa insuficijencijom i utvrđivanja potrebe za suplementacijom.

Ključne reči: osteoporoza; koštani biomarkeri; vitamin D; praćenje terapije.

Uvod

Nastanak osteoporoze je rezultat disbalansa između procesa stvaranja i resorpcije kostiju. Karakteriše se smanjenom koštanom masom i poremećajem mikroarhitekture koštanog tkiva, što vodi do povećane fragilnosti kostiju, te posledično do većeg rizika za nastanak fraktura. Kost zahvaćena osteoporozom odlikuje se izraženim gubitkom minerala, uz smanjenje gustine koštane mase. Teška osteoporoza podrazumeva i prisustvo patoloških fraktura (1).

U regulaciji remodelovanja kostiju kod žena važnu ulogu ima estradiol. Sinteza ovog hormona značajno opada u menopauzi, što dovodi do iznenadnog i brzog gubitka koštane mase, čime se stimuliše razvoj osteoporoze. U određenim populacijama verovatnoća za nastanak fraktura u menopauzi dostiže i 40%, što je blisko verovatnoći za razvoj kardiovaskularnih bolesti (1).

Dijagnoza osteoporoze postavlja se osteodenzitometrijom. Danas se DEXA metoda (eng. *dual-energy X-ray absorptometry*) smatra zlatnim standardom za rano otkrivanje osteoporoze, kao i za praćenje terapije. Ovom metodom se procenjuje mineralna gustina kostiju (eng. *bone mineral density*, BMD), koja se najčešće izražava u vidu T ili Z skora. T skor predstavlja odstupanje BMD vrednosti pacijenta od srednje vrednosti BMD mlade odrasle osobe ženskog pola, izraženo u broju standardnih devijacija (SD). Dijagnoza osteoporoze se postavlja ukoliko je mineralna gustina kostiju manja od $-2,5$ SD (2).

Primena BMD u kliničkoj praksi u cilju procene rizika od fraktura ukazala je na izvesne nedostatke ovog parametra. Naime, utvrđeno je da BMD ima nisku osetljivost, jer se prelomi mogu javiti i kod pacijenata sa osteopenijom (T skor manji od -1 , a veći od $-2,5$ SD). Stoga su u novije vreme istraživanja usmerena ka identifikaciji drugih faktora rizika, pored BMD, kao i ispitivanju prediktivne sposobnosti koncentracije koštanih biomarkera, sa ciljem da se tačnije proceni rizik od fraktura (3). To je dovelo do razvoja FRAX skora (eng. *Fracture Risk Assessment Tool*), kojim se procenjuje verovatnoća za nastanak fraktura u narednih 10 godina. Primenom FRAX skora omogućen je individualni pristup pacijentu, jer on objedinjuje prisutne faktore rizika sa rizikom procenjenim na osnovu BMD vrata femura (3).

Laboratorijski testovi za procenu metabolizma koštanog tkiva podrazumevaju određivanje statusa minerala i markera sinteze i resorpcije kostiju. U toku procesa formiranja kostiju osteoblasti sekretuju osteokalcin, peptide prokolagena tipa I i alkalnu fosfatazu (ALP), dok se tokom procesa razgradnje kostiju oslobađaju piridinolini, kao i N- i C terminalni telopeptidi kolagena tipa I. Povišene vrednosti koštanih biomarkera u serumu ili urinu ukazuju na viši stepen remodelovanja kostiju, odnosno na povećan gubitak koštane mase (4). Istraživači EPIDOS studije su među prvima utvrdili značajnu vezu između koncentracije koštanih biomarkera i rizika od preloma kuka tokom dvogodišnjeg praćenja pacijenata sa osteoporozom (5).

Cilj lečenja osteoporoze je prevencija nastanka ili ponavljanja fraktura. Prema Evropskom vodiču za dijagnozu i terapiju osteoporoze, u terapiji se najčešće primenjuju

bisfosfonati, derivati paratiroidnog hormona (PTH), denosumab i stroncijum-ranelat (6). Za razliku od BMD, koji pruža informacije o terapijskom učinku tek posle godinu dana, određivanjem koncentracije koštanih biomarkera efekat terapije se može sagledati nakon znatno kraćeg perioda (6).

U ovoj prospektivnoj studiji pratili smo pacijentkinje sa osteoporozom tokom tri meseca, sa ciljem da utvrdimo značaj određivanja koštanih biomarkera u proceni rizika od fraktura i praćenju terapije osteoporoze.

Materijal i metode

Ispitanici

U studiji je učestvovalo 48 pacijentkinja Instituta za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“, starosti $64,6 \pm 9,4$ godina. Svim pacijentkinjama je potvrđena osteoporoza na osnovu rezultata BMD (T skor medijana: $-3,2$ SD, interkvartilni raspon: $-3,8 - -2,7$ SD). Većina pacijentkinja ($n=46$) je bila u menopauzi u trajanju od $15,8 \pm 9,3$ godina. Kod 43 pacijentkinje menopauza je nastupila prirodnim putem, dok je kod 5 pacijentkinja menopauza posledica histerektomije. Konzilijum lekara za osteoporozu je svim pacijentkinjama ordinirao antiresorptivnu (bisfosfonati) ili anaboličku (PTH) terapiju, u kombinaciji sa vitaminom D (1000 IJ/dan) i pojačanim dijetarnim unosom kalcijuma.

Protokol studije

Na početku studije prikupljeni su demografski i klinički podaci o pacijentkinjama, koji su bili relevantni za ovo istraživanje (starost, telesna težina i visina, uzrok i dužina trajanja menopauze, porodična istorija osteoporoze, prethodne frakture kostiju i njihova lokacija, podaci o životnim navikama – fizička aktivnost, unos alkohola i pušenje). Iz podataka za visinu i težinu izračunat je indeks telesne mase (ITM). Uzorci krvi za laboratorijska ispitivanja su uzeti na početku studije, pre nego što je započeta terapija, kao i tri meseca nakon primene propisane terapije. Istraživanje je planirano i izvedeno poštujući etičke principe Helsinške deklaracije, a na osnovu odobrenja Etičkog odbora Instituta za ortopedsko-hirurške bolesti „Banjica“.

Biohemijske analize

Uzorci krvi iz prednje kubitalne vene su uzeti u jutarnjim časovima, posle noćnog gladovanja, pre početka i nakon tri meseca od početka uzimanja terapije. Serum je izdvojen od krvnih ćelija u toku jednog sata i uzorci analizirani na biohemijskom analizatoru Olympus AU 640 (BeckmanCoulter Ireland Inc, Ireland) i imunochemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Aktivnost ALP je određena IFCC preporučenom metodom. Koncentracije osteokalcina i C terminalnog peptida određene su metodom elektrohemiluminiscencije (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), a koncentracija 25(OH)D kompetitivnim elektrohemiluminiscentnim testom (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany).

Procena rizika od fraktura

Svim pacijentkinjama je procenjen globalni rizik od fraktura i rizik za frakturu kuka unarednih 10 godina primenom FRAX kalkulatora Svetske zdravstvene organizacije. FRAX skor rizika je izračunat na osnovu podataka o: polu, starosti, telesnoj težini i visini, porodičnoj istoriji osteoporoze, prethodnim frakturama ili reumatoidnom artritisu u istoriji bolesti, pušenju, konzumiranju alkohola, primeni glukokortikoida, sekundarnoj osteoporozi i vrednosti BMD skora vrata femura. Visok rizik od frakture kuka u narednih 10 godina definisan je na osnovu granične vrednosti FRAX skora od 3%. Granična vrednost FRAX skora za globalni rizik od fraktura je bila $\geq 20\%$ (3).

Statistička analiza

Kontinuirani podaci su prikazani kao aritmetičke srednje vrednosti i standardne devijacije za normalno distribuirane parametre. Promenljive koje nisu pratile normalnu raspodelu prikazane su kao medijane i interkvartilni rasponi. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne ili relativne frekvence. Razlike između grupa u slučaju normalno distribuiranih kontinuiranih podataka su analizirane Student-ovim t-testom, a za promenljive koje ne prate normalnu raspodelu korišćen je Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis-ov test. Razlike između kategoričkih promenljivih proveravane su upotrebom Chi-kvadrat testa. Efekat terapije je analiziran primenom Student-ovog t-testa za razliku parova, kada su promenljive pratile normalnu raspodelu. Za asimetrično distribuirane podatke efekat terapije je analiziran primenom Wilcoxon-ovog testa za uparene uzorke. Za proveru korelacije između parametara korišćena je Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza. Binarnom logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost koncentracija koštanih markera sa BMD. Kao minimalni uslov za postojanje statističke značajnosti smatrana je verovatnoća $P \leq 0,05$.

Rezultati

U ispitivanoj grupi najučestaliji faktori rizika za razvoj osteoporoze bili su fizička neaktivnost (85,3% pacijentkinja) i pušenje (25% pacijentkinja). Porodičnu istoriju osteoporoze potvrdilo je 8 pacijentkinja. Skoro polovina ispitanica (47,9%) je imala povišen ITM ($>25 \text{ kg/m}^2$), a svaka osma pacijentkinja je bila gojazna. Prethodne frakture kostiju utvrđene su kod 29 žena, od čega je 51,7% imalo frakturu distalnog radijusa, 27,6% frakturu pršljena, a 6,9% frakturu proksimalnog femura. Višestuke frakture imalo je 13,8% pacijentkinja.

Analiza uticaja pušenja, kao važnog faktora rizika za nastanak osteoporoze, pokazala je da je BMD skor niži, a koncentracija C terminalnog peptida viša u grupi žena koje puše, ali bez statističke značajnosti (pušači, medijana: 546,0 pg/mL; interkvartilni raspon: 451,7-750,9 pg/mL vs. nepušači, medijana: 527,8 pg/mL; interkvartilni raspon: 334,4-740,5 pg/mL; $P=0,495$). U dodatnoj analizi među pušačima utvrdili smo da žene koje dnevno konzumiraju više od 10 cigareta ($n=8$) imaju značajno niže vrednosti BMD skora (medijana: -3,8; interkvartilni raspon: -4,2 – -3,2) od žena

koje konzumiraju do 10 cigareta na dan (medijana: -2,8; interkvartilni raspon: -2,6 – 0,8; $P < 0,05$). Takođe, aktivnost ALP je bila značajno viša ($P < 0,05$) kod žena koje konzumiraju više od 10 cigareta (medijana: 80 IJ/L; interkvartilni raspon: 74-99 IJ/L) nego kod žena koje konzumiraju do 10 cigareta u toku dana (medijana: 71 IJ/L; interkvartilni raspon: 46-74 IJ/L).

Sa ciljem da se utvrdi kako se biohemijski markeri osteoporoze menjaju u zavisnosti od promene mineralne gustine kostiju, sve pacijentkinje su razvrstane na osnovu tercilnih vrednosti BMD skora. Tri grupe pacijentkinja su bile sličnih godina i nisu se razlikovale po ITM i periodu trajanja menopauze (Tabela I). Analiza markera sinteze i resorpcije kostiju je pokazala značajne promene u koncentraciji osteokalcina ($P < 0,05$) i aktivnosti ALP ($P < 0,05$) sa smanjenjem mineralne gustine kostiju (Slika 1). U *post-hoc* analizi je utvrđeno da su koncentracije osteokalcina kod pacijentkinja sa najnižom mineralnom gustinom kostiju (I tercil BMD skora) značajno više ($P < 0,05$) od koncentracija kod pacijentkinja sa najvišim vrednostima BMD (III tercil). Na sličan način, utvrdili smo da je aktivnost ALP kod pacijentkinja sa najnižom mineralnom gustinom kostiju (I tercil BMD skora) značajno veća od aktivnosti ALP izmerene kod pacijentkinja u II tercilu ($P < 0,05$) i III tercilu ($P < 0,01$) BMD skora. Spearman-ova korelaciona analiza je potvrdila da je BMD u inverznoj korelaciji sa aktivnošću ALP ($r = -0,403$; $P < 0,01$) i koncentracijom osteokalcina ($r = -0,316$; $P < 0,05$).

Tabela I Kliničke karakteristike pacijentkinja po tercilima BMD

Table I Clinical characteristics of the patients according to BMD tertiles

	BMD T skor, SD			<i>P</i>
	I tercil (-5,4 – -3,5)	II tercil (-3,4 – -2,7)	III tercil (-2,6 – 1,7)	
Starost, godine	62,1 ± 8,6	66,3 ± 10,5	65,3 ± 8,9	0,416
Trajanje menopauze, godine	12,6 ± 8,7	17,4 ± 10,2	17,6 ± 8,5	0,241
ITM, kg/m ²	24,69 ± 4,16	25,17 ± 4,06	24,37 ± 3,48	0,842

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom.

Uzimajući u obzir prethodne rezultate, analiza je nastavljena sa ciljem da se ispita značaj određivanja koncentracije osteokalcina i aktivnosti ALP u predviđanju progresije demineralizacije koštanog tkiva. Rizičnu grupu činile su pacijentkinje u I tercilu (BMD skor $\leq -3,5$ SD), a referentnu grupu pacijentkinje u III tercilu BMD skora (BMD skor $\geq -2,6$ SD). Primenom binarne logističke regresione analize utvrdili smo da rizik za smanjenje mineralne koštane mase raste za 12% ukoliko se koncentracije osteokalcina poveća za 1SD (OR = 1,118; 95% CI: 1,012-1,234; $P < 0,05$). Na sličan način smo

utvrdili da sa porastom aktivnosti ALP za 1SD rizik za smanjenje mineralne koštane mase raste za 10% (OR = 1,105; 95% CI: 1,014-1,203; $P < 0,05$).

Na početku studije globalni rizik od fraktura u narednih 10 godina u ispitivanoj grupi pacijentkinja u proseku je iznosio 14,1% (medijana: 12%; interkvartilni raspon: 7,2-16%). Prosečan rizik za frakturu kuka iznosio je 6,7% (medijana: 4,2%; interkvartilni raspon: 1,5-7,6%). Visok rizik od frakture kuka u narednih 10 godina imalo je 62,8% pacijentkinja. Na osnovu granične vrednosti FRAX skora za globalni rizik od fraktura $\geq 20\%$ u kategoriju visokog rizika svrstano je 16,7% pacijentkinja. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama markera sinteze i resorpcije kostiju između pacijentkinja sa visokim i niskim rizikom od frakture kuka. Takođe, koncentracije koštanih biomarkera se nisu značajno razlikovale između pacijentkinja sa niskim rizikom i pacijentkinja koje imaju visok globalni rizik od fraktura u narednim godinama.

U nastavku analize ispitivali smo efekat terapije na vrednosti koštanih biomarkera. Na terapiji bisfosfonatima bile su 32 pacijentkinje, dok je anaboličku terapiju koristilo 16 pacijentkinja. Terapija bisfosfonatima tokom 3 meseca značajno je snizila koncentracije osteokalcina i C terminalnog peptida (Tabela II). Koncentracije osteokalcina su snižene u proseku za 32% (medijana: -32,3%; interkvartilni raspon: -48,4 – 24,0%), a koncentracije C terminalnog peptida za 60% (medijana: -59,9%; interkvartilni raspon: -78,5 – -39,2%). Klinički značajan pad koncentracije C terminalnog peptida ($\geq 35\%$) je zabeležen kod 78,1% pacijentkinja, dok je značajan pad koncentracije osteokalcina ($\geq 25\%$) utvrđen kod 68,8% pacijentkinja.

Tabela II Markeri sinteze i resorpcije kostiju na početku studije i nakon 3 meseca terapije
Table II Markers of bone synthesis and resorption at the study entry and after 3 months of therapy

	Pre terapije	Posle terapije	<i>P</i>
Terapija bisfosfonatima (n=32)			
ALP, IJ/L	78 (71-87)	56 (42-80)	0,093
Osteokalcin, $\mu\text{g/L}$	28,3 (21,9-35,5)	17,1 (14,7-22,8)	<0,001
C terminalni peptid, pg/mL	578,9 (397,4-755,7)	175,8 (119,2-297,1)	<0,001
Terapija sintetskim PTH (n=16)			
Osteokalcin, $\mu\text{g/L}$	24,9 (18,3-28,8)	44,2 (31,8-53,6)	<0,01
C terminalni peptid, pg/mL	505,7 (350,1-701,8)	525,4 (362,8-968,5)	0,279

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i poređeni Wilcoxon-ovim testom za uparene uzorke.

Nakon primene PTH tokom 3 meseca značajno je porasla koncentracija osteokalcina. U proseku, porast koncentracije osteokalcina je iznosio 64% (medijana: 64,1%; interkvartilni raspon: 35,6 – 123,5%). Razlika u koncentraciji C terminalnog peptida nije bila statistički značajna (Tabela II). U skladu sa prethodnim, značajan pad

($\geq 35\%$) koncentracije C terminalnog peptida zabeležen je samo kod 7,7% žena, dok je značajan porast osteokalcina ($\geq 25\%$) utvrđen kod 85,7% pacijentkinja.

Relativne promene koncentracija C terminalnog peptida i osteokalcina nakon terapije su dodatno evaluirane uzimajući u obzir početni FRAX skor rizika od fraktura u narednih 10 godina. Rezultati na Slici 2 prikazuju medijane relativnih promena koncentracija C terminalnog peptida i osteokalcina u zavisnosti od FRAX skora. Uočava se da je pad koncentracije C terminalnog peptida nakon terapije izraženiji kod pacijentkinja koje su na početku studije imale nizak rizik za frakturu kuka, iako razlika nije statistički značajna ($P=0,129$). Slično, promene u koncentraciji oba koštana biomarkera bile su veće u grupi sa početnim niskim rizikom od fraktura.

Na kraju smo analizirali uticaj suplementacije tokom tri meseca na status vitamina D (Tabela III). Utvrdili smo da je na početku studije tek četvrtina pacijentkinja (25,5%) imala optimalne koncentracije 25(OH)D u serumu, dok je tešku deficijenciju imalo 17% žena sa osteoporozom. Posle tri meseca suplementacije optimalne koncentracije 25(OH)D je imalo 83% pacijentkinja, a umerenu deficijenciju ovog vitamina 17% pacijentkinja. Nakon suplementacije nije bilo slučajeva sa teškom deficijencijom. Rezultati Chi-kvadrat testa su potvrdili da je nakon tri meseca suplementacije većina pacijentkinja poboljšala status vitamina D, u odnosu na stanje sa početka studije ($P<0,001$).

Tabela III Status vitamina D kod svih pacijentkinja na početku studije i nakon 3 meseca suplementacije

Table III Vitamin D status at the study entry and after 3 months of supplementation in all patients

Parametar	Pre terapije	Posle terapije	<i>P</i>
25(OH)D, nmol/L	49,15 ± 2,84	91,24 ± 2,77	$P<0,001$
Teška deficijencija (< 25 nmol/L), %	17	0	$P<0,001$ #
Umerena deficijencija (25-60 nmol/L), %	57,5	17	
Optimalna koncentracija (60-200 nmol/L), %	25,5	83	

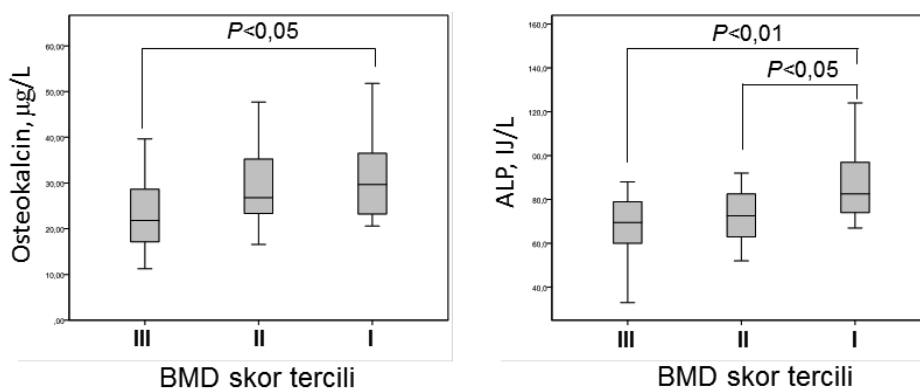
Podaci su poređeni Chi-kvadrat testom.

Diskusija

Poslednjih godina postignut je veliki napredak u razumevanju kliničkog značaja koštanih biomarkera kod pacijenata sa osteoporozom. Ako se uzme u obzir fiziološki proces remodelovanja kostiju, idealni biomarkeri osteoporoze bi trebalo da omogućе postavljanje dijagnoze ovog oboljenja, odabir adekvatnog vida terapije (antiresorptivna ili anabolička) i njeno praćenje, kao i da unaprede predviđanje rizika za nastanak

fraktura na osnovu BMD. U ovoj prospektivnoj studiji pratili smo pacijentkinje sa osteoporozom tokom tri meseca sa ciljem da utvrdimo značaj određivanja koštanih biomarkera u proceni rizika od fraktura i praćenju efekata terapije. U tu svrhu odabrana su dva markera sinteze i resorpcije kostiju (ALP i C terminalni telopeptid) i osteokalcin, kao marker ukupnog koštanog prometa.

Naši rezultati su pokazali da povećanje koncentracije koštanih biomarkera u serumu dobro korelira sa smanjenjem mineralne gustine kostiju. Naime, utvrdili smo da se najviše vrednosti osteokalcina i ALP javljaju kod pacijentkinja sa najnižim BMD (Slika 1), a da sa porastom oba parametra značajno raste rizik za smanjenje mineralne koštane mase. Prema našim rezultatima, na osnovu vrednosti ovih parametara moguće je predvideti rizik za gubitak mineralne koštane mase u slučaju nelečene osteoporoze, što može biti od značaja za pravovremeno uvođenje terapije. Pored toga, ovaj nalaz govori u prilog određivanju koncentracije osteokalcina i aktivnosti ALP u inicijalnoj proceni rizika od fraktura, budući da su prethodne studije pokazale da je povećanje vrednosti BMD, ali i koštanih biomarkera, povezano sa njihovim nastankom (7).



Slika 1. Koncentracija osteokalcina i aktivnost ALP po tercilima BMD skora
Figure 1. Osteocalcin concentration and ALP activity according to BMD score tertiles

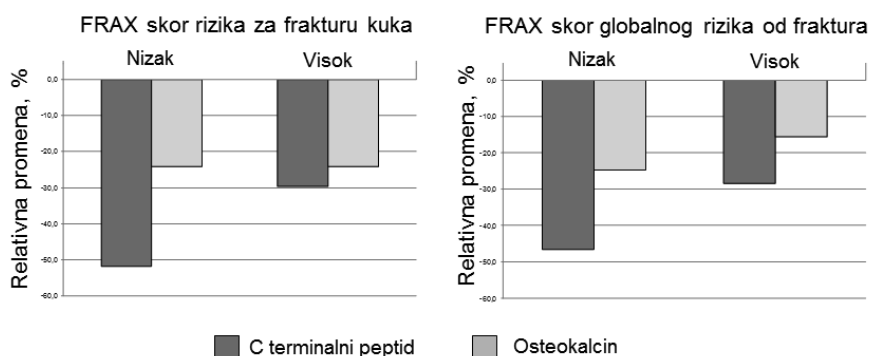
Savremeni klinički pristup pacijentima sa osteoporozom podrazumeva procenu rizika za nastanak fraktura u narednih 10 godina, primenom algoritama koji kombinuju BMD i ostale prisutne faktore rizika, a u svrhu odabira adekvatne terapije za svakog pacijenta. Značaj ispitivanja faktora rizika je pokazan i u ovoj studiji, jer smo utvrdili da kod pušača dolazi do smanjenja mineralne gustine kostiju i porasta koncentracije koštanih biomarkera u serumu. Vremenski okvir naše studije nije bio dovoljno dug da zabeležimo nastanak fraktura kao jedan od ishoda, niti da ispratimo promene BMD nakon terapije, te smo svim pacijentkinjama procenili rizik za nastanak fraktura na početku studije primenom FRAX skora. Pošto se za procenu rizika ne uzimaju u obzir vrednosti koštanih biomarkera, uporedili smo koncentracije markera sinteze i resorpcije kostiju kod pacijenata sa niskim i visokim FRAX skorom rizika. Rezultati su pokazali

da razlike u koncentracijama koštanih biomarkera između pacijentkinja sa visokim i niskim rizikom za frakturu kuka, kao i među grupama pacijentkinja sa niskim i visokim globalnim rizikom od fraktura u narednih 10 godina nisu bile značajne. U nedavnoj meta-analizi Morris i saradnici (8) su utvrdili da je prediktivna vrednost koštanih biomarkera u proceni rizika za nastanak fraktura kod pacijenata sa osteoporozom umerena. Naši rezultati se slažu sa zaključcima koje su izveli ovi autori (8), a takođe ukazuju da se vrednosti koštanih biomarkera ne mogu koristiti za stratifikaciju pacijenata prema stepenu rizika od fraktura.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, najviše je dokaza koji govore u prilog određivanju koštanih biomarkera za praćenje terapije osteoporoze. Promene biohemijskih markera stvaranja i/ili resorpcije kostiju nakon uvođenja terapije su mnogo brže i veće u poređenju sa BMD (9). Na osnovu preporuka međunarodnih vodiča za lečenje osteoporoze, lekovi prve linije u prevenciji fraktura su bifosfonati, te je i najveći broj naših pacijentkinja primao ovu terapiju. Antiresorptivna aktivnost bifosfonata ogleda se u redukciji mobilizacije i aktivacije osteoklasta, kao i njihovoj ubrzanoj apoptozi, a većina lekova iz ove grupe indukuje pad prometa kostiju u roku od nekoliko nedelja ili meseci (10). U skladu sa prethodnim, kod naših pacijentkinja koje su bile na antiresorptivnoj terapiji došlo je do statistički značajnog pada nivoa koštanih markera već nakon tri meseca od uvođenja terapije (Tabela II). Koncentracije osteokalcina snižene su u proseku za 32% u odnosu na vrednosti pre početka terapije, a koncentracije C terminalnog peptida za 60%. Klinički značajan pad koncentracije C terminalnog peptida je zabeležen kod 78,1% pacijentkinja, dok je značajan pad koncentracije osteokalcina utvrđen kod 68,8% pacijentkinja. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima da antiresorptivna terapija dovodi do ranijeg pada koncentracije markera resorpcije, a kasnije i do sniženja koncentracije markera formiranja kostiju (10).

Anabolička terapija osteoporoze ima za cilj da pospeši izgradnju koštanog matriksa. Naši rezultati su pokazali da tri meseca od početka anaboličke terapije dolazi do značajnog povećanja koncentracije osteokalcina (Tabela II), pri čemu je porast utvrđen kod 85,7% pacijentkinja. Koncentracija C terminalnog peptida, koji predstavlja marker resorpcije kostiju, nije se značajno promenila, što se i moglo očekivati. Uzimajući u obzir ekonomske aspekte laboratorijskih određivanja, naši rezultati pokazuju da se određivanje pojedinačnog markera sinteze ili resorpcije kostiju, umesto kompletnog panela koštanih biomarkera, može smatrati dovoljnim za brzu procenu efikasnosti i adhirencije tokom terapije osteoporoze, što su takođe primetili i drugi autori (11). U tom smislu, efekte antiresorptivne terapije moguće je pratiti određivanjem koncentracije C terminalnog telopeptida, a efekte anaboličke terapije određivanjem osteokalcina.

Rezultati ove studije izdvojili su osteokalcin kao važan parametar za praćenje pacijenata sa osteoporozom. Osteokalcin je indikator sintetske funkcije osteoblasta i njegova serumska koncentracija korelira sa brzinom formiranja koštanog matriksa. Međutim, pošto se oslobađa iz koštanog matriksa i tokom resorpcije, osteokalcin se smatra markerom koštanog prometa (4). U našoj studiji koncentracija osteokalcina se menjala kao odgovor na i antiresorptivnu i na anaboličku terapiju (Tabela II). Pored toga, nivo osteokalcina na početku studije bio je u značajnoj korelaciji sa BMD. Iako se konačni efekti terapije procenjuju na osnovu vrednosti BMD, najranije godinu dana od početka terapije, moglo bi se očekivati da će koncentracije ovog biomarkera i nakon godinu dana terapije pokazati značajnu vezu sa BMD, što bi trebalo potvrditi u prospektivnim istraživanjima sa dužim periodom praćenja. Ovde treba napomenuti da su brojne studije potvrdile da je smanjenje rizika za nastanak fraktura, kao posledica terapije osteoporoze, u snažnijoj vezi sa smanjenjem nivoa koštanih biomarkera nego sa povećanjem BMD (10). Posmatranjem promena C terminalnog peptida i osteokalcina tri meseca nakon uvođenja terapije, utvrdili smo da je pozitivan učinak izraženiji kod pacijentkinja koje su na početku studije imale nizak FRAX rizik za frakturu kuka (Slika 2). Ovaj nalaz sugerise da bi analiza pomenutih markera u kraćim vremenskim razmacima mogla biti korisna za prognozu konačnih terapijskih efekata.



Slika 2. Promene u koncentraciji C terminalnogpeptida i osteokalcina nakon 3 meseca terapije u odnosu na početni rizik za frakturu kuka i globalni rizik od fraktura

Figure 2. Changes in C terminal telopeptide and osteocalcin concentrations after 3 months of therapy in relation to initial risk for hip fracture and global risk of fractures

Nedostatak vitamina D je dobro potvrđen faktor rizika za nastanak osteoporoze i osteomalacije (12). U ovom istraživanju smo potvrdili da više od polovine pacijentkinja sa osteoporozom ima umerenu deficijenciju vitamina D, dok je čak 17% njih u stadijumu teške deficijencije, koja se može objasniti efektima snižene koncentracije estrogena u menopauzi (13). Očekivano, nakon suplementacije tokom tri meseca optimalne koncentracije 25(OH)D u serumu imalo je 83%, a umerenu deficijenciju ovog vitamina 17% pacijentkinja (Tabela III). Na ovaj način smo potvrdili da vitamin D ima

suštinsku ulogu u homeostazi koštanog prometa, što je u skladu sa literaturnim podacima (14). Za razliku od vitamina D, stavovi u pogledu pojačanog dijetarnog unosa kalcijuma u prevenciji i terapiji osteoporoze nisu usaglašeni. Naime, ranije je opisana veza između pojačanog unosa kalcijuma i rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, kao posledica vaskularne kalcifikacije, što bi trebalo uzeti u obzir kada se dodatak kalcijuma u ishrani savetuje starijim osobama. Sa druge strane, u nedavno publikovanoj meta-analizi autori su zaključili da rezultati dosadašnjih istraživanja nisu pružili dovoljno dokaza o postojanju uzročno-posledične veze između pojačanog dijetarnog unosa kalcijuma i razvoja kardiovaskularnih oboljenja (15).

Treba napomenuti da ova studija ima nekoliko ograničenja. Najpre, pošto ovo istraživanje nije uključilo kontrolnu grupu, nismo bili u mogućnosti da analiziramo razlike u koncentracijama koštanih biomarkera između pacijentkinja sa osteoporozom i zdravih žena. Sem toga, naša studija je pratila pacijentkinje tokom tri meseca, pa nije bilo moguće uvideti da li je primenjena terapija dovela do značajne promene BMD, što predstavlja zlatni standard za praćenje terapije osteoporoze, ali se može meriti tek nakon godinu dana od početka terapije. S obzirom da je većina naših pacijentkinja bila u menopauzi, neophodna su dodatna istraživanja koja bi pokazala efekat pola i starosti pacijenta na uspešnost terapije osteoporoze.

Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da je određivanje koštanih biomarkera značajno u proceni rizika za smanjenje mineralne gustine kostiju i praćenju efekata terapije osteoporoze. Takođe, ova studija je potvrdila važnost određivanja koncentracije 25(OH)D za procenu statusa vitamina D u osteoporozi, u cilju otkrivanja pacijenata sa insuficijencijom i utvrđivanja potrebe za suplementacijom. Danas se kao najveće prepreke za širu primenu koštanih biomarkera kod pacijenata sa osteoporozom ističe veliki broj dostupnih parametara koji se neselektivno određuju, nedostatak standardizacije metoda i velika biološka varijacija analita (16). Sa daljim razvojem specifičnih i ekonomičnih testova moglo bi se očekivati da će određivanje ovih biohemijskih markera postati deo standardnog protokola za praćenje pacijenata na antiresorptivnoj i anaboličkoj terapiji osteoporoze.

Zahvalnica

Autori sa Katedre za medicinsku biohemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta su finansijski podržani sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Projekat br. 175035).

Literatura

1. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporos Int* 2000;1:669-74.
2. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi: Osteoporoza. Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Beograd: Ministarstvo zdravlja RS, Medicinski fakultet u Beogradu, 2004.
3. Kanis JA, Hans D, Cooper C, Baim S, Bilezikian JP, Binkley N, et al. Interpretation and use of FRAX in clinical practice. *Osteoporos Int* 2011;22:2395-411.
4. Garnero P. Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporosis Rep* 2009;7:84-90.
5. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1531-8.
6. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2013;24:23-57.
7. Chubb SA, Byrnes E, Manning L, Beilby JP, Ebeling PR, Vasikaran SD, et al. Reference intervals for bone turnover markers and their association with incident hip fractures in older men: the Health in Men study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:90-9.
8. Morris HA, Eastell R, Jorgensen NR, Cavalier E, Vasikaran S, Chubb SA, et al. Clinical usefulness of bone turnover marker concentrations in osteoporosis. *Clin Chim Acta* 2017;467:34-41.
9. Vasikaran SD, Cooper C, Kanis JA. Recommendations for bone marker standards in osteoporosis: what, why and where to now? *Ann Clin Biochem* 2011;48:91-2.
10. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc* 2008;67:157-62.
11. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011;22:391-420.
12. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:585-91.
13. Tanzy ME, Camacho PM. Effect of vitamin D therapy on bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis and osteopenia. *Endocr Pract* 2011;17:873-9.
14. Lerchbaum E. Vitamin D and menopause - a narrative review. *Maturitas* 2014;79:3-7.
15. Chung M, Tang AM, Fu Z, Wang DD, Newberry SJ. Calcium intake and cardiovascular disease risk: an updated systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2016; 165:856-66.
16. Brown JP. Bone turnover markers: defining a therapeutic target. *Clin Biochem* 2016;49:527-8.

Significance of bone biomarkers determination in the assessment of fracture risk and response to therapy in patients with osteoporosis

Andelka Milić¹, Milena Đurić¹, Gordana Gajić¹, Milan Mitrović¹,
Ljiljana Urošević¹, Veljko Jovanović¹, Budimir Ješić¹,
Radmila Kovačević¹, Jelena Vekić^{2*}, Aleksandra Zeljković²,
Aleksandra Stefanović², Ana Ninić², Vesna Spasojević-Kalimanovska²

¹ Institute for Orthopedic Surgery "Banjica", Belgrade, Serbia;

² University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of Medical Biochemistry,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: Jelena Vekić

Tel. + 381 11 3951 266; e-mail: jelena.vekić@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Osteoporosis is characterised by reduced bone mineral density (BMD), increased bone fragility and risk of fractures. We investigated clinical significance of bone turnover biomarkers determination for the prediction of fracture risk and response to therapy. We performed three months follow-up study in 48 women with osteoporosis. During the follow-up period 32 patients were on antiresorptive and 16 patients received anabolic therapy. Serum alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, C-terminal telopeptide of collagen type I and vitamin D were measured before and 3 months after initiation of the therapy. Higher osteocalcin and ALP levels were significantly associated with increased risk of BMD loss. Following antiresorptive therapy levels of C-terminal telopeptide ($P<0.001$) and osteocalcin ($P<0.001$) significantly decreased. Anabolic therapy significantly increased osteocalcin ($P<0.01$). At the study entry 25.5% of the patients had optimal levels of 25(OH)D and 17% had severe vitamin D deficiency. Vitamin D supplementation during three months improved vitamin D status of the patients ($P<0.001$). In conclusion, our data indicate that osteocalcin and C-terminal telopeptide determination may be useful for BMD loss prediction and monitoring of osteoporosis therapy. This study confirmed importance of vitamin D testing in osteoporosis in order to detect the patients with deficiency and determine the need for supplementation.

Keywords: osteoporosis; bone biomarkers; vitamin D; therapy monitoring.
