

## Marcatori del ricambio osseo

L'osso è un tessuto metabolicamente molto attivo, nel quale i processi di formazione e riassorbimento sono continui per tutta la vita. Il tessuto osseo è costituito da **cellule** e da una matrice extracellulare comprendente sia una **componente organica** (il 35%, e principalmente, per il 90%, il **collagene di tipo I**) sia una **componente inorganica** (il 65% principalmente **Calcio (Ca)** e **fosfato (P)** sotto forma di **cristalli di idrossiapatite**).

Due sono i tipi di **cellule** ossee:

- ↳ gli **osteoblasti**, che sono cellule di origine mesenchimale a forma cuboide, dotate di nucleo eccentrico di App. di Golgi ben sviluppato e abbondante RER a dimostrazione della loro spiccata attività di sintesi. Sono ricchi di piridossalfosfato, sintetizzano il collagene di tipo I e l'osteocalcina. Inoltre sono provvisti di recettori per il paratormone;
- ↳ gli **osteoclasti**, che fanno parte della famiglia dei monociti/macrofagi. Quindi derivano dal midollo osseo. I precursori mononucleati si fondono ed originano qs giganti multinucleati aventi da 2 a molte centinaia di nuclei. Sono ricchi di mitocondri e di lisosomi (proprio a dimostrazione della loro attività catabolica) ed hanno un gran numero di recettori per la calcitonina. Presentano una caratteristica polarizzazione in senso basale-apicale con un bordo superiore assai frastagliato con ripiegamenti multipli. Tra i loro enzimi lisosomali ricordiamo proprio la fosfatasi acida.

Per quanto concerne la **componente organica**, il **collagene di tipo I** rappresenta circa il 90% della matrice organica ossea. E' una struttura a tripla elica fatta da tre catene, ricche di prolina e idrossiprolina. Il collagene viene sintetizzato come precursore avente una lunga serie di aa amminoterminali e carbossiterminali. Queste estensioni verranno poi clivate durante i processi di secrezione e formazione.

Per quanto concerne la **componente inorganica**, l'entrata e l'uscita degli ioni Ca e P nella fase minerale dell'osso sono sotto il controllo di 3 differenti ormoni.

- ↳ il **paratormone (PTH)** regola il livello di calcio ionizzato nei liquidi extracellulari in 3 modi: (i) ne fa aumentare il riassorbimento osseo, (ii) ne fa aumentare il riassorbimento nei tubuli renali, (iii) ne fa aumentare il riassorbimento a livello intestinale favorendo la trasformazione della vitamina D nel suo derivato attivo 1,25(OH)2D3;
- ↳ la **vitamina D** si forma nella pelle grazie alla conversione del 7-deidrocolesterolo in vitamina D3 o colecalciferolo (CC) che verrà idrossilato a 25 OH nel fegato e poi, nel rene, passerà a calcitriolo (1,25 OH). Il calcitriolo è un potentissimo stimolatore dell'assorbimento del calcio e del fosforo a livello intestinale. In condizioni normali il calcitriolo promuove la crescita ossea e la formazione di osso fornendo adeguati livelli di minerale. Se però l'assunzione con la dieta è insufficiente il calcitriolo agisce direttamente sullo scheletro promuovendo il riassorbimento di Ca e P;
- ↳ la **calcitonina** inibisce il riassorbimento di Ca dall'osso, riducendo di conseguenza la concentrazione di Ca nel siero; diminuisce l'escrezione fecale di Ca ed esercita, analogamente al PTH, un effetto fosfaturico.

Le malattie dell'osso, in particolare l'osteoporosi, rappresentano un grosso problema sanitario, che affligge approssimativamente metà delle donne e un quarto degli uomini sopra i cinquant'anni, per un costo stimato di oltre 10 miliardi nei soli Stati Uniti. Dal momento che l'età media della popolazione è in aumento, la diagnosi, il trattamento ed il monitoraggio dell'osteoporosi e di altre malattie metaboliche dell'osso diventeranno temi sempre più importanti. I marcatori ossei costituiscono quindi un nuovo e potenzialmente rilevante strumento clinico per la diagnosi ed il monitoraggio del

metabolismo osseo, essendo *non invasivi, poco costosi*, e dando *risposte molto più rapide* rispetto allo strumento diagnostico classico, cioè la mineralometria a raggi X. La densità minerale ossea impiega infatti 2 o 3 anni per mostrare variazioni significative, per esempio in risposta ad una terapia anti-riassorbitiva. I marcatori ossei segnalano invece molto più velocemente eventuali cambiamenti: da 1 a 3 mesi per i marcatori di riassorbimento e da 6 a 9 mesi per i marcatori di formazione.

I marcatori ossei riflettono i meccanismi fisiopatologici della malattia dell'osso. Sono generalmente aumentati in pazienti con malattie in cui il turnover osseo è aumentato come il Morbo di Paget, l'iperparatiroidismo o l'ipotiroidismo. Diminuiscono invece in quei pazienti in cui il turnover è rallentato, come l'ipotiroidismo o l'ipopituitarismo.

Tra i **marcatori di formazione** dell'osso vanno ricordati:

↳ la **fosfatasi alcalina ossea**: questo marcatore aumenta solitamente in quei disordini primitivamente associati ad un' aumentata velocità di formazione dell'osso, come il morbo di Paget, l'iperparatiroidismo, l'osteomalacia, il rachitismo ed il carcinoma metastatico. Aumenti minori sono presenti in altre condizioni che comprendono l'osteoporosi, l'ipertiroidismo, le epatopatie croniche e l'insufficienza renale cronica. I metodi immunologici attualmente disponibili per il dosaggio della ALP ossea sono stati approvati dalla FDA per l'utilizzo nel monitoraggio del morbo di Paget. Tuttavia un test è stato utilizzato con successo per il monitoraggio della terapia con bisfosfonati dell'osteoporosi. Gli studi clinici dimostrano che la ALP è un indicatore sensibile ed affidabile del metabolismo osseo. In generale i dosaggi dei marcatori su siero sono meno influenzati dalla variabilità diurna e biologica rispetto ai dosaggi effettuati sulle urine; inoltre l'emivita di questo enzima è relativamente lunga e questo probabilmente contribuisce alla bassa variazione diurna che è stata segnalata per la ALP ossea. L'utilità del dosaggio della ALP per valutare la risposta alla terapia anti-riassorbitiva è stata ben documentata in corso di morbo di Paget. Questa malattia viene frequentemente trattata con bisfosfonati e calcitonina, con successivo monitoraggio della risposta biochimica utilizzando la determinazione della ALP totale. Nei casi meno gravi, dove è necessario un dosaggio più sensibile e specifico, la ALP ossea si è dimostrata più efficace. Ci sono dati incoraggianti anche per quanto riguarda l'utilizzo di questo marcatore nel valutare il rischio di fratture indipendentemente dalla densità minerale ossea. Benché siano necessari ulteriori studi di conferma, questi risultati suggeriscono la possibilità che l'ALP ossea possa essere un test complementare alla mineralometria a raggi X per donne che si trovano di fronte a una importante decisione circa le cure e le terapie da intraprendere quando raggiungono la menopausa.

↳ l'**osteocalcina**: dal momento che i dosaggi immunologici per l'osteocalcina utilizzano l'osteocalcina bovina come standard e la processazione metabolica della proteina rilasciata in circolo produce frammenti con epitopi molto diversi fra loro, si assiste ad una grossa discrepanza nel riconoscere queste forme molecolari da parte dei vari tipi di dosaggio disponibili. L'applicazione dei dosaggi dell'osteocalcina nella pratica clinica di routine è stata quindi ostacolata a causa di questa grossa variabilità nei risultati che dipende dal kit utilizzato. In base alle conoscenze attuali sulla sintesi ed il catabolismo dell'osteocalcina si può affermare che il dosaggio della molecola intatta insieme ad un grande frammento N-terminale ed intermedio della molecola fornisce la valutazione più accurata di formazione ossea. Un importante problema non ancora del tutto chiarito è la possibilità che il riassorbimento osteoclastico contribuisca alle specie immunoreattive dell'osteocalcina che sono individuate da alcuni dosaggi. In generale, i livelli sierici di osteocalcina sono elevati nei pazienti con malattie caratterizzate da elevato turnover osseo, come l'iperparatiroidismo primario e secondario, l'ipertiroidismo e l'acromegalia. Il morbo di Paget rappresenta un'eccezione in quanto l'ALP (sia totale che ossea) è un predittore migliore della gravità della malattia rispetto all'osteocalcina. La proteina diminuisce nell'ipotiroidismo,

nell'ipoparatiroidismo, nei pazienti trattati con corticosteroidi ed in alcuni pazienti affetti da mieloma e ipercalcemia maligna. Riflette inoltre i cambiamenti attesi nella formazione dell'osso dopo interventi terapeutici o chirurgici;

- ↳ **i peptidi di estensione del procollagene 1 (PINP, PICP):** sono stati sviluppati dosaggi immunologici per entrambi i marcatori. Per quanto riguarda il PINP la concentrazione può variare anche di 100 volte secondo il metodo utilizzato, fatto che sembra indicare una probabile eterogeneità delle forme circolanti di PINP. Nonostante il PINP correli con l'osteocalcina sierica e con la fosfatasi alcalina, è generalmente meno sensibile di questi altri due marcatori nell'evidenziare anomalie nel turnover osseo. Il PICP sierico è debolmente correlato con la formazione ossea misurata istomorfometricamente (valori di  $r$  da 0,36 a 0,5) in pazienti con osteoporosi. La menopausa induce un significativo ma marginale (20%) aumento nel PICP, che però non correla con il successivo tasso di perdita di massa ossea misurato in densitometria.

Tra i **marcatori di riassorbimento** dell'osso vanno ricordati:

- ↳ la **fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP)**: si possono trovare valori elevati in diverse malattie metaboliche dell'osso in cui il turnover è aumentato e nell'osteoporosi vertebrale. Tuttavia, la scarsa specificità della TRAP plasmatica per l'attività osteoclastica, la sua instabilità in campioni congelati e la presenza di enzimi inibitori nel siero, hanno notevolmente limitato l'utilizzo clinico di questo marcatore. I dati presenti in letteratura indicano che la caratterizzazione di questo enzima è ancora largamente incompleta. Ciò potrebbe essere dovuto a difficoltà analitiche non ancora risolte e al fatto che l'enzima è rilasciato a livello del microambiente creato dagli osteoclasti, piuttosto che direttamente in circolazione. In conclusione, ulteriori studi sono necessari per migliorare le prestazioni analitiche dei dosaggi e per valutare l'effettiva utilità di questo marcatore nel monitoraggio del metabolismo osseo;
- ↳ l'**idrossiprolina**: per molti anni la misura dell'idrossiprolina urinaria è stata considerata il dosaggio standard per determinare il riassorbimento osseo. Tuttavia la mancanza di tessuto-specificità rende debole la correlazione tra questo marcatore ed il riassorbimento osseo misurato mediante biopsia ossea. Valutazioni più precise si possono ottenere utilizzando l'HPLC, anche se questo metodo non consente una facile applicabilità alla routine clinica;
- ↳ il **telo peptide-N-terminale (NTX)**: la valutazione del telopeptide N-terminale del collagene mediante dosaggio immunologico è indicata per il controllo della terapia ormonale anti-riassorbitiva nella post-menopausa, della terapia anti-riassorbitiva nell'osteoporosi e nel morbo di Paget. Le caratteristiche di questo marcatore non sono ancora state completamente chiarite, invece, per quanto riguarda la predizione del rischio di frattura nei pazienti con osteoporosi e per il monitoraggio dei pazienti con iperparatiroidismo e ipertiroidismo. È stato dimostrato che l'NTX costituisce un marcatore in grado di rilevare in modo particolarmente sensibile e precoce i cambiamenti nel riassorbimento osseo che si verificano in condizioni fisiologiche, come l'inizio della menopausa, dovuti ad una diminuzione di estrogeni, o a una terapia anti-riassorbimento. I valori medi dell'NTX per le donne peri- e post-menopausa si sono dimostrati rispettivamente del 24 e del 133% più alti della media (pre-menopausa). In pazienti osteoporotiche in tarda menopausa è stato osservato addirittura un aumento del 171% rispetto alla media pre-menopausa. La semplificazione del dosaggio dell'NTX ha permesso un suo più ampio utilizzo nella pratica clinica e la realizzazione di linee guida per il medico. Un altro utilizzo potenzialmente importante del dosaggio dell'NTX è nella gestione dei pazienti con tumori. In uno studio di Demers e collaboratori è stato riportato che i valori di NTX discriminano tra pazienti con e senza metastasi ossee;
- ↳ il **C-telo peptide (CTX)**: gli studi clinici effettuati per valutare i dosaggi del CTX si sono concentrati soprattutto sull'uso potenziale di tali marcatori per il follow-up della terapia e sull'uso prognostico per stimare il rischio di perdita ossea e di fratture osteoporotiche, sia da solo che in combinazione

con le determinazioni di massa ossea. Recentemente è stato messo in commercio un dosaggio ELISA per il CTX sierico, che elimina gli inconvenienti e la variabilità dovuti alla correzione dei risultati sull'escrezione urinaria di creatinina. Per quanto riguarda il follow-up della terapia il dosaggio del CTX si è rivelato utile per definire la giusta dose di farmaco anti-riassorbimento e per prevedere la risposta del paziente alla terapia stessa. Numerosi studi confermano che le donne in post-menopausa che subiscono fratture osteoporotiche, mostrano un marcato aumento dei valori ottenuti con il dosaggio ELISA rispetto non solo ai valori pre-menopausa, ma anche rispetto a donne sane della stessa età. È stato inoltre dimostrato che i valori di base (ovvero i valori ottenuti precedentemente alla frattura) del dosaggio ELISA e di altri marcatori del riassorbimento osseo possono essere usati per prevedere le fratture dell'anca. Questo studio indica poi che l'aumentato riassorbimento osseo (evidenziato da elevati valori del CTX) è in grado di predire le fratture dell'anca *indipendentemente* dalla bassa massa ossea. Di conseguenza, la bassa massa ossea e l'aumento del CTX sono fattori di rischio ulteriori per questo tipo di frattura; la combinazione della densità ossea e delle determinazioni del riassorbimento osseo è perciò utile per migliorare la predizione di rischio di fratture osteoporotiche;

- ⇒ i ***crosslinks del piridinolinio (Pyr e D-Pyr)***: l'escrezione di Pyr e D-Pyr è significativamente elevata nelle malattie con un turnover osseo aumentato, soprattutto quando predomina un aumentato riassorbimento. Tali malattie includono il morbo di Paget, le osteopatie secondarie a carcinomi, l'iperparatiroidismo primario, l'osteodistrofia renale, l'osteomalacia, l'ipertiroidismo, l'ipercalcemia da immobilizzazione e l'osteoporosi. L'entità dell'aumento nell'escrezione può essere un indice della gravità della malattia. Sono stati fatti notevoli sforzi nel tentativo di definire il valore del dosaggio dei crosslink del piridinolinio nel trattamento dell'osteoporosi. Nelle donne in post-menopausa con osteoporosi si osserva un incremento significativo dei marcatori nelle urine ed è possibile dimostrare una maggiore variabilità nei valori in caso di osteoporosi rispetto alle donne normali in post-menopausa. È stata riscontrata una distribuzione bimodale dell'escrezione in donne in post-menopausa, fatto che potrebbe riflettere l'esistenza di un sottogruppo di soggetti che perdono tessuto osseo velocemente, i cosiddetti "fast losers". I crosslink correlano negativamente con la densità minerale ossea dell'anca, della colonna vertebrale e dell'avambraccio, come dimostrato con la mineralometria a raggi X a doppia energia (DXA). In un ampio gruppo di donne anziane, l'escrezione di D-Pyr libero al di sopra del limite superiore del range in pre-menopausa era associata ad un rischio significativamente aumentato di fratture dell'anca. La combinazione della densità minerale ossea con il dosaggio dei crosslinks può quindi migliorare la capacità di predire chi è ad elevato rischio di frattura. Infine il dosaggio dei crosslink, come osservato anche per altri marcatori, può essere utilizzato per confermare la risposta a terapie antirassorbitive, molto prima che possa essere evidenziato un significativo cambiamento della densità minerale ossea.