

Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů

I. GRADOŠOVÁ¹, K. JOSEFOVÁ¹, H. ŽIVNÁ², P. ŽIVNÝ¹, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN UK Hradec Králové

²Vivárium a Radioizotopové laboratoře, LF UK Hradec Králové

SOUHRN

Gradošová I., Josefová K., Živná H., Živný P., Palička V.: **Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů**

Cíl práce: Sledovali jsme vliv ezetimibu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar.

Materiál a metody: Dospělí potkani (240 ± 10 g BW) byli rozděleni do 2 skupin po 8 zvířatech. Jednou denně žaludeční sondou po dobu 8 týdnů byla podávána 1. kontrolní skupině (KON) *aqua pro inj.* (0,2 ml/100 g BW) a 2. skupině byl podáván ezetimib (EZE) (0,1 mg v 0,2 ml *aqua pro inj.*/100 g BW). Vyšetřovali jsme v séru ukazatele kostního obrátu: C-terminální telopeptid kolagenu I (ICTP), osteocalcin (OC), kostní formu izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) pomocí metody ELISA. Dále jsme hodnotili hustotu kostního minerálu pomocí dvouenergie rentgenové absorpciometrie (DXA).

Výsledky: Po 8 týdnech došlo u skupiny EZE k mírnému snížení sérové koncentrace PINP ($p = 0,34$) na 90 %, ICTP ($p = 0,28$) na 91 % a k mírnému nárůstu OC ($p = 0,23$) na 111 %, BALP ($p = 0,88$) na 103 % vs. KON. Vyhodnocením kostní minerální denzity nebyly nalezeny rozdíly mezi skupinami.

Závěr: Ezetimib v dávce 0,1 mg/100 g BW pravděpodobně neovlivňuje negativně kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar.

Klíčová slova: ezetimib, PINP, ICTP, OC, BALP

SUMMARY

Gradošová I., Josefová K., Živná H., Živný P., Palička V.: **Effect of ezetimibe on the bone metabolism in rats**

Objective: We studied the influence of ezetimibe on bone metabolism in adult male albino Wistar rats.

Material and Methods: Adult rats (240 ± 10 g) were divided into 2 groups of eight animals. 1. control group was administered *aqua pro injectione* (0.2 ml/100 g BW; gavage), 2. ezetimibe was administered (in 0.2 ml *aqua pro injectione*/100 g BW; gavage) rats daily for eight weeks. We evaluated markers of bone turnover in serum: C-terminal telopeptide of collagen I (ICTP), osteocalcin (OC), N-terminal propeptide of procollagen I (PINP) and bone alkaline phosphatase (BALP) using enzyme immunoassay method (ELISA). Bone mineral density (BMD) was measured with dual energy X-ray absorptiometry.

Results: The rats with ezetimibe application had decreased concentration of PINP ($p = 0.34$) to 90 %, ICTP ($p = 0.28$) to 91 % and increased OC ($p = 0.23$) to 111 %, BALP ($p = 0.88$) to 103 % in comparison to control group. There were no differences in BMD between the two groups.

Conclusion: Ezetimibe (0.1 mg/100 g BW) did not show any negative influence on bone metabolism in healthy male albino Wistar rats.

Keywords: ezetimibe, PINP, ICTP, OC, BALP

Osteologický bulletin 2009;14(4):156–161

Adresa: Mgr. Iveta Gradošová, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: gradosovai@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 10. 12. 2009

Přijato k tisku: 30. 12. 2009

Úvod

Hypercholesterolémie je jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů rozvoje aterosklerózy, která vede k vážným zdravotním komplikacím, především ischemické chorobě srdeční, cévním příhodám mozkovým a ischemickému onemocnění dolních končetin. Rozvoj aterosklerózy lze zpomalit řadou léků, ale zatím nebyla věnována dostatečná pozornost jejich vlivu na kostní metabolismus. Tento vliv by byl zvláště významný u starých lidí, kterým s postupujícím věkem kostní hmota ubývá.

Během života dochází k neustálé remodelaci kostní tkáně, za kterou zodpovídají buňky kostní novotvorby – osteoblasty, původem z mezenchymálních buněk, a buňky kostní resorpce – osteoklasty, které mají původ v buňkách monocytů – makrofágové linie [1]. Nerovnováha v aktivitě těchto buněk vede ke kostním onemocněním. Za jedno z nejčastěj-

ších metabolických onemocnění skeletu se považuje osteoporóza (OP) [2,3]. OP je systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem minerálu kosti, změnou její mikroarchitektury i množství a druhů nekolagenních proteinů a tím větší náchylností ke zlomeninám. Fraktury jsou nejčastější v oblasti s vyšším podílem trabekulární kosti tzn. obratle, distální předloktí a proximální část stehenní kosti [2]. Hypercholesterolémie a osteoporóza jsou častá onemocnění u lidí v pokročilém věku. Protože mnoho léků negativně ovlivňuje kostní metabolismus (glukokortikoidy, antiepileptika, heparin a další) vyvstává důležitá otázka, zda léky snižující koncentrace cholesterolu v séru neovlivňují kostní metabolismus, ať již pozitivně či negativně.

Ezetimib (*obr. 1*) je hypolipidemikum ze skupiny selektivních inhibitorů absorpce cholesterolu (CHOL) v kartáčovém lemu buněk střevní mukózy [4]. Zabraňuje vstřebávání

dietního a žlučového cholesterolu ze střevního lumen do enterocytů blokádu transportního proteinu Niemann – Pick C1 like protein 1 (NPC1L1) [5,6,7]. Transportní protein je zejména přítomen v duodenu a v proximální části tenkého střeva, v místech maximálního vstřebávání CHOL [5]. Ezetimib neovlivňuje absorpci TAG (triacylglycerolů), mastných kyselin, žlučových kyselin, progesteronu, etinyl-estradiolu a vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K) [8], což je výhodné pro kostní tkáň. Estrogenní hormony, vitamíny D a K mají důležitou úlohu v řízení kostního metabolismu. Účastní se na novotvorbě kostní tkáně. Ezetimib významně snižuje plazmatické hladiny LDL-CHOL (low-density lipoprotein LDL) a zvyšuje HDL-CHOL (high-density lipoprotein HDL) a v menší míře snižuje TAG u pacientů s hypercholesterolémií [9]. Pod vlivem ezetimibu dochází ke snížení nabídky cholesterolu játrům s následným zvýšením exprese LDL-receptorů a zvýšením vychytávání částic LDL z plazmy [4]. Ezetimib vstupuje do enterocytů, kde dochází k jeho glukuronidaci na aktivní metabolit. Ten vstupuje portálním oběhem do jater a žlučí je zpětně secernován do střevního lumen, kde se váže na kartáčový lem enterocytů [10]. Po absorpci v cévní stěně se hydrolyzuje a je zpět vyloučen do lumen střeva a celý cyklus se opakuje. Tento enterohepatální oběh zajišťuje vysokou koncentraci a dlouhodobé působení ezetimibu i jeho metabolitu [11]. Studie na zvířatech potvrdily, že glukuronovaný derivát je účinnější inhibitor absorpce CHOL, než samotný ezetimib [10] (viz obr. 1).

Snížená absorpce cholesterolu ve střevě má však za následek zvýšenou endogenní syntézu cholesterolu v játrech prostřednictvím reductázy 3 – hydroxy – 3 – methylglutaryl – koenzymu A (HMG-CoA reductáza). Z tohoto důvodu je výhodné ezetimib kombinovat se statiny (inhibitory HMG-CoA reductázy), které syntézu CHOL inhibují [4]. U statinů bylo již zjištěno, že mají vliv na kostní tkáň jak stimulací kostní novotvorby, tak i anti-resorpčním účinkem [12]. Ezetimib podávaný spolu se statinem je indikován k terapii u pacientů s primární hypercholesterolémií (heterozygotní familiární nebo nefamiliární) a homozygotní familiární hypercholesterolémií. V monoterapii pacientům, u kterých není podávání statinu vhodné a dále u homozygotní sitosterolémie nebo u primární hypercholesterolémie [9].

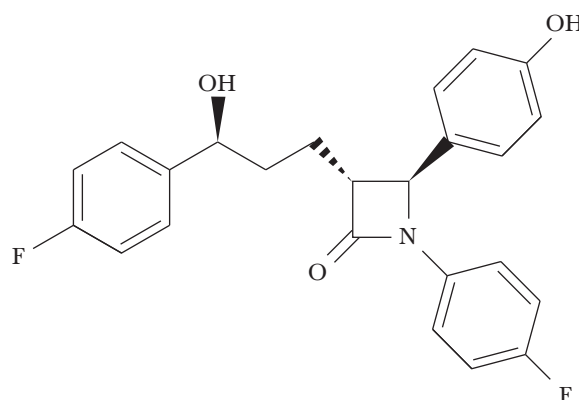
Naším záměrem bylo zjištění vlivu ezetimibu na kostní metabolismus. Sledovali jsme vliv ezetimibu na kostní tkáň u dospělých zdravých samců potkanů kmene Wistar vyhodnocením sérových ukazatelů kostního obratu a změřením BMD. Kostní novotvorbu jsme sledovali měřením sérové koncentrace osteokalcinu (OC), aktivity kostní formy izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a koncentrace aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP); jako ukazatel kostní resorpce jsme sledovali koncentraci karboxyterminálního telopeptidu kolagenu typu I (ICTP).

Materiál a metody

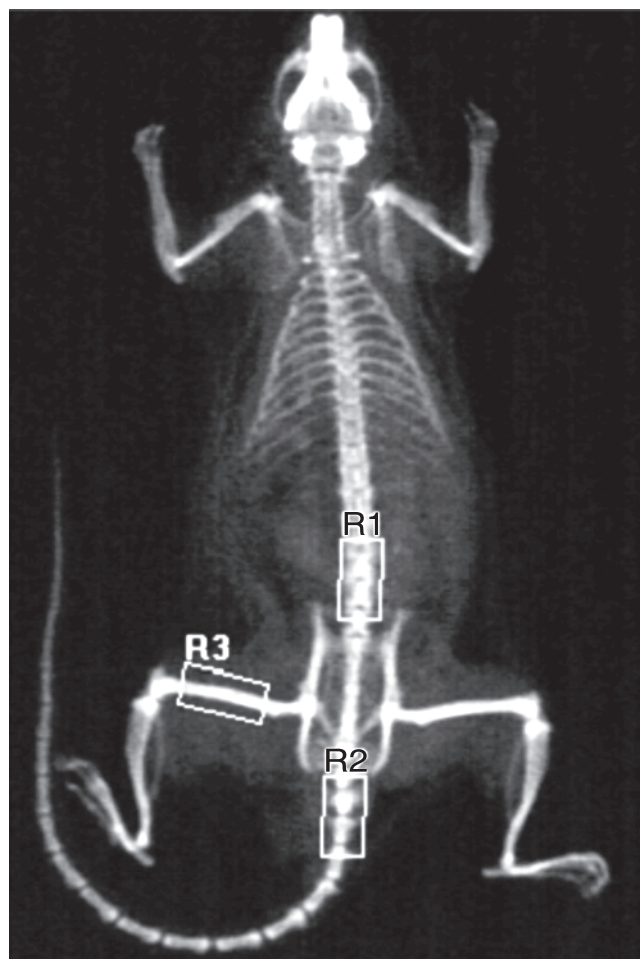
Experimentální studie byla provedena podle projektu pokusů schváleného Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LFUK-HK. Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota

22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %) v plastických klecích po 4 zvířatech. V experimentu bylo použito 16 samců potkanů kmene Wistar (Biotest s.r.o., Konárovice) s tělesnou hmotností 240 ± 10 g na počátku pokusu, kteří byli rozděleni do dvou skupin po 8 zvířatech. Byli krmeni standardní laboratorní dietou (ST-1, VELAS, a.s., Lysá nad

Obr. 1
Chemický strukturální vzorec ezetimibu



Obr. 2
Rentgenový snímek potkana; vyznačeny oblasti hodnocení kostní minerální hustoty (BMD)



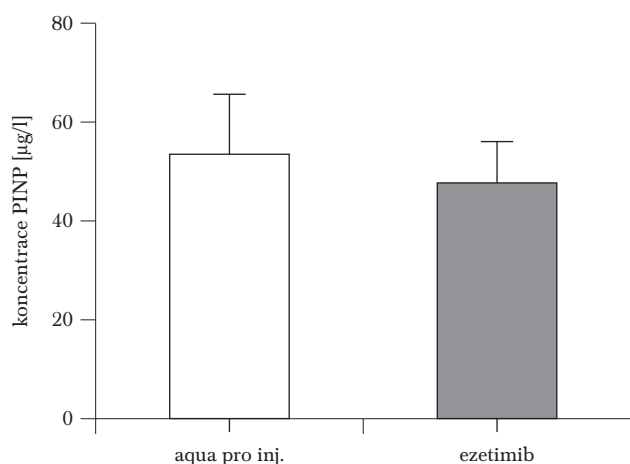
Labem) a pitnou vodou *ad libitum*. Kontrolní skupině potkanů (1. KON) byla podávána *aqua pro injectione* (0,2 ml/100 g BW) a pokusné skupině (2. EZE) ezetimib (0,1 mg v 0,2 ml *aqua pro inj.*/100 g BW) (Ezetrol, MSP

Tabulka 1
Vliv ezetimibu na denzitu kostního minerálu (BMD)
po 8 týdnech

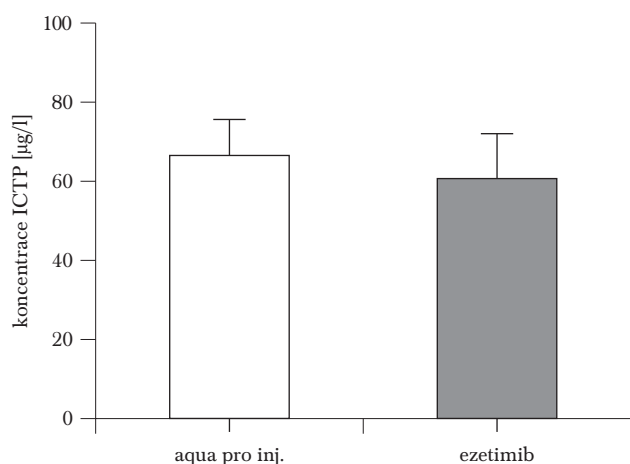
DXA (g/cm ²)	aqua pro inj.	ezetimib
R1	0,223 ± 0,014	0,212 ± 0,005
R2	0,222 ± 0,012	0,228 ± 0,004
R3	0,189 ± 0,021	0,173 ± 0,008

R1 = oblast bederních obratlů, R2 = oblast ocasních obratlů,
R3 = oblast femuru, DXA = dvouenergie rentgenová
absorpciometrie

Graf 1
Sérové koncentrace N – terminálního propeptidu
prokolagenu typu I (PINP) po 8 týdnech



Graf 2
Sérové koncentrace C – terminálního telopeptidu
kolagenu I (ICTP) po 8 týdnech



Singapore Copany, LLC., Nizozemsko) perorálně žaludeční sondou 1x denně vždy v dopoledních hodinách po dobu 8 týdnů.

Po 8 týdnech podávání ezetimibu byla potkanům změřena hustota kostního minerálu (BMD, g/cm²) pomocí dvouenergie rentgenové absorpciometrie (Dual-Energy X-ray Absorptiometry, DXA) na přístroji Hologic Delphi A v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK). Vyšetření bylo prováděno v celkové anestézii (5 mg midazolamu/kg BW a 100 mg ketaminu/kg BW; i. m.). Denzita kostního minerálu byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného programu (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). BMD jsme hodnotili v bederní a ocasní části obratlů a v oblasti femuru (obr. 2).

Druhý den byla zvířata usmrcena odběrem krve z břišní aorty v celkové anestézii parami éteru ve funkční digestoři. V krevním séru, které bylo získáno po usmrcení a zamraženo na -80 °C, jsme následně stanovili metodou ELISA koncentrace ukazatele kostní resorpce: C – terminální telopeptid kolagenu I (ICTP, RatLaps™ EIA (µg/l), Immunodiagnostic Systems Ltd.) a ukazatelů kostní novotvorby: osteokalcin (OC, Rat-MID™ Osteocalcin EIA (µg/l), Immunodiagnostic Systems Ltd.), N – terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, Rat/Mouse PINP EIA (µg/l), Immunodiagnostic Systems Ltd.) a aktivitu kostní formy izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP, Rat bone alkaline phosphatase (U/l), Uscnlife Sciences & Technology Co., Ltd)

Statistická analýza byla provedena programem SigmaStat 3.1 Jandel Scientific® (San Rafael, CA, USA) pomocí nepárového *t-testu*. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

U potkanů, kterým byl podáván ezetimib, došlo po 8 týdnech ke statisticky nevýznamnému snížení sérové koncentrace PINP ($47,72 \pm 8,11 \mu\text{g/l}$) na 90 % v porovnání s kontrolní skupinou ($53,30 \pm 12,28 \mu\text{g/l}$) ($p = 0,34$) (graf 1). Dále došlo k nevýznamnému snížení sérové koncentrace ICTP ($60,71 \pm 11,40 \mu\text{g/l}$) na 91 % vs. KON ($66,63 \pm 9,04 \mu\text{g/l}$) ($p = 0,28$) (graf 2). Sérová koncentrace OC ($237,05 \pm 34,69 \mu\text{g/l}$) se nevýznamně zvýšila na 111 % vs. KON ($214,13 \pm 29,05 \mu\text{g/l}$) ($p = 0,23$) (graf 3) na 103 % v porovnání s KON ($12,78 \pm 5,09 \text{ U/l}$) ($p = 0,88$) (graf 4).

V oblasti bederních obratlů a femuru došlo u potkanů s aplikovaným ezetimibem k statisticky nevýznamnému snížení BMD ($p = 0,07$). V oblasti ocasních obratlů došlo k mírnému zvýšení BMD, i když statisticky nevýznamnému ($p = 0,27$) (tabulka 1).

Diskuze

U starších lidí se postupně rozvíjejí choroby, které jsou dlouhodobě léčeny medikamentózně (arteriální hypertenze, dyslipidémie a hypercholesterolemie, *diabetes mellitus* 2. typu aj.). Současně s postupujícím věkem dochází k úbytku kostní tkáně, čímž se zvyšuje riziko zlomenin. Dokonce samotná dyslipidémie i hypercholesterolemie mají negativní efekt na kostní tkáň [13,14,15]. Bylo zjištěno, že aterosenní lipidy *in vitro* inhibují diferenciaci osteoblastů [13].

Dále bylo prokázáno, že hypercholesterolémie u myši podporuje diferenciaci osteoklastů [14] a snižuje BMD [15]. U žen po menopauze s profilem aterogenních lipidů nalezli Orozco et al. sníženou BMD v oblasti bederních obratlů a femuru [16]. V longitudinální studii prezentovali Tankó et al. u postmenopauzálních žen ve věku 50–75 let s největším zvýšením sérového cholesterolu největší snížení BMD v oblasti bederních obratlů nezávisle na změně BMI (body mass index) [17]. Majima et al. zjistili u pacientů s hypercholesterolémií nárůst sérové koncentrace INTP (aminoterminální telopeptid kolagenu I) u žen i mužů a BALP pouze u žen. Jak BALP tak INTP u mužů negativně korelovaly s HDL-CHOL, u žen pozitivně s celkovým CHOL a LDL-CHOL [18]. Výsledky z literatury naznačují zvýšený kostní obrát u pacientů jak s hypercholesterolémií, tak s dyslipidémií bez ohledu na pohlaví. Léčba hypercholesterolémie a dyslipidémie je důležitá nejen pro prevenci kardiovaskulárních chorob, ale normalizací sérových lipidů se též brání úbytku kostní tkáně a vzniku následných fraktur [16,17,18]. Klade-me si otázku, jaký vliv má nový lék ezetimib na kostní tkáň, zda podporuje úbytek kostní tkáně či naopak může být dlou-

hodobě užíván, aniž by pacientovi hrozilo zvýšené nebezpečí fraktur.

V experimentu jsme použili zdravé dospělé samce potkanů kmene Wistar, u kterých jsme mohli sledovat vliv samotného léku na jejich kostní tkáň. Reaktivita kostní tkáně nebyla modifikována ani absencí pohlavních hormonů, ani přidruženými chorobami (obezita, dyslipidémie nebo arteriální hypertenze).

U těchto experimentálních zvířat jsme po osmi týdnech podávání ezetimibu (0,1 mg/100 g BW) neprokázali žádné signifikantní změny v sérových koncentracích ukazatelů kostního obrátu.

OC představuje hlavní nekolagenní protein v kostní tkáni, který je secernovaný převážně osteoblasty a při novotvorbě kostní tkáně je z části uvolňován do systémové cirkulace [19]. BALP je součástí membrán osteoblastů a při jejich aktivaci lze enzym prokázat v krevním séru. Její hodnota velmi dobře koreluje s intenzitou kostní novotvorby [20].

PINP, jako ukazatel kostní novotvorby, vzniká odštěpením proteolytickými enzymy z prokolagenu typu I s následným uvolněním do krevní cirkulace [21]. Ukazatelé kostní resorpce, amino- a karboxyterminální telopeptid kolagenu I (INTP, ICTP) jsou uvolňovány do séra v průběhu kostní degradace [22].

Naše výsledky svědčí pro nesignifikantní změny kostního metabolismu po podání ezetimibu. Vyhodnocením denzity kostního minerálu jsme nezaznamenali žádné statisticky významné změny jak v bederní a ocasní části obratlů, tak ani femuru.

Závěr

Naše studie naznačuje, že dlouhodobé užívání ezetimibu pravděpodobně nemá negativní vliv na kostní metabolismus. U dospělých samců potkanů, kterým byl podáván ezetimib, jsme zjistili zpomalený kostní obrát s nevýznamným zvýšením kostní novotvorby. Podáváním ezetimibu nedošlo ke klinicky významným změnám kostní tkáně, můžeme se tedy domnívat, že ezetimib pravděpodobně nepůsobí negativně na kostní tkáň.

Druhotný pozitivní vliv na kostní tkáň bychom snad mohli předpokládat u pacientů s hypercholesterolémií, kterým léčba normalizuje hladinu sérového cholesterolu.

Tyto závěry plánujeme ještě ověřit na potkanech s indukovanou hypercholesterolémií.

Experiment byl proveden na laboratorním zvířeti, a proto k potvrzení našich výsledků bude nutno další studium této problematiky u lidí užívajících ezetimib.

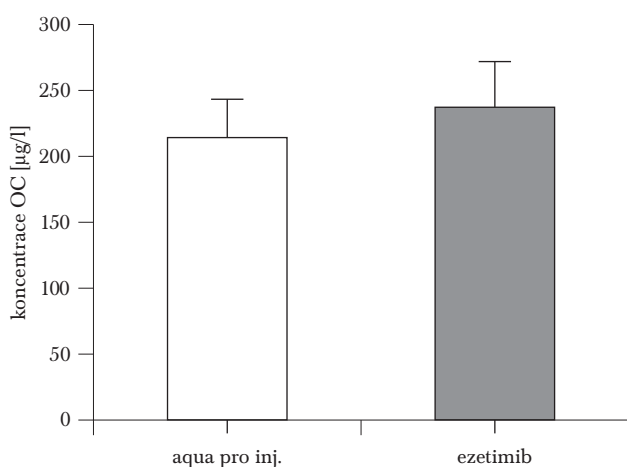
Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a grantem Lékařské fakulty UK v Hradci Králové s podporou firmy Roche.

Seznam zkratk

BALP	kostní forma izoenzymu alkalické fosfatázy (bone alkaline phosphatase),
BMD	kostní minerální hustota (bone mineral density),
BW	tělesná hmotnost (body weight),
DXA	dvouenergieová rentgenová absorpciometrie (Dual-Energy X-ray Absorptiometry),

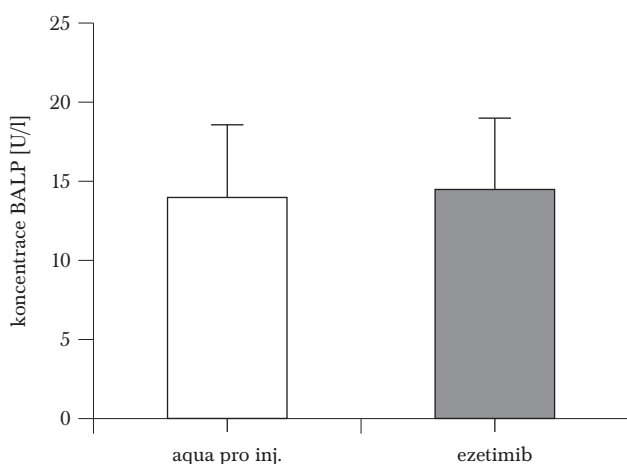
Graf 3

Sérové koncentrace osteokalcinu (OC) po 8 týdnech



Graf 4

Sérové aktivity kostní formy izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) po 8 týdnech



ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay),
EZE	ezetimib,
HDL-CHOL	lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein),
HMG-CoA CHOL	3 – hydroxy – 3 – methylglutaryl – koenzym A, cholesterol,
ICTP	karboxyterminálního telopeptidu kolagenu typu I,
i. m.	intramuskulární,
INTP	aminoterminální telopeptid kolagenu I,
KON	kontrolní skupina,
LDL-CHOL	lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein),
NPC1L1	Niemann – Pick C1 like protein 1,
OC	osteokalcin,
OP	osteoporóza,
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I,
SD	směrodatná odchylka (standard deviation),
ST-1	standardní laboratorní dieta,
TAG	triacylglyceroly.

Literatura

- McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Alter Med Rev* 2007;12(2):113–145.
- Poole KE, Compston JE. Osteoporosis and its management. *BMJ* 2006;333(7581):1251–1256.
- Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005;115(12):3318–332.
- Rudel LL. Preclinical and clinical pharmacology of a new class of lipid management agents. *Am J Manag Care* 2002;8(2 Suppl):S33–35.
- Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann – Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201–1204.
- Shepherd J. Lipids in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2004;32(6):1051–1056.
- Kramer W, Glombik H, Petry S, Heuer H, Schäfer H, Wendler W, Corsiero D, Girbig F, Weyland C. Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter. *FEBS Lett* 2000;487(2):293–297.
- van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Davis HR. Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *Br J Pharmacol* 2001;134(2):409–417.
- Jeu L, Cheng JW. Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH 58235), a cholesterol – absorption inhibitor. *Clin Ther* 2003;25(9):2352–2387.
- van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR Jr. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol* 2000;129(8):1748–1754.
- Bultas, J. Ezetimib – selektivní inhibitor absorpce cholesterolu. *Remedia* 2004;14(2):214–216.
- Jadhav, SB, Jain, GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(1):3–18.
- Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL. 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *J Biol Chem* 2002;277(16):14221–14226.
- Tintut Y, Morony S, Demer LL. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2004;24(2):e6–10.
- Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:182–188.
- Orozco P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal women. *Eur J Epidemiol* 2004;19(12):1105–1112.
- Tankó LB, Bagger YZ, Nielsen SB, Christiansen C. Does serum cholesterol contribute to vertebral bone loss in postmenopausal women? *Bone* 2003;32(1):8–14.
- Majima T, Shimatsu A, Komatsu Y, Satoh N, Fukao A, Ninomiya K, Matsumura T, Nakao K. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. *Endocr J* 2008;55(1):143–151.
- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37(Pt 4):432–446.
- Anh DJ, Dimai HP, Hall SL, Farley JR. Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors. *Calcif Tissue Int* 1998;62(4):332–340.
- Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 2008;54(1):188–196.
- Herrmann M, Seidel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;393(2):57–75.