Биохимические маркеры метастазирования в кости

Н. В. Любимова, Н. Е. Кушлинский

ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: *Нина Васильевна Любимова biochimia@mtu-net.ru*

Метастазирование в кости – одно из наиболее частых и опасных осложнений злокачественных опухолей. Достижения последних лет в изучении молекулярных механизмов костного ремоделирования способствовали поиску чувствительных и специфичных критериев, отражающих интенсивность процессов остеолиза и остеосинтеза при метастатическом поражении скелета. В обзоре охарактеризованы наиболее информативные и получившие внедрение в клиническую практику биохимические маркеры формирования и резорбции костной ткани. Приведены данные об их возможном использовании в диагностике, мониторинге и прогнозе поражения скелета злокачественными опухолями разной локализации. Интерес к биохимическим маркерам костного ремоделирования как неинвазивным методам обследования онкологических больных усиливается по мере внедрения в клиническую практику современных лабораторных технологий. Работы последних лет свидетельствуют о возможности их применения не только в целях мониторинга и прогноза, но и для проведения ранней диагностики метастазов в костях. Представлены результаты собственных исследований ключевых биохимических маркеров остеолиза (С-концевого телопептида коллагена I типа (СТХ)) и остеосинтеза (костной щелочной фосфатазы (КЩФ)) на основе иммуноферментного анализа в сыворотке крови 238 больных раком молочной железы (РМЖ). Установлена зависимость секреции КЩФ и СТХ от клинических проявлений метастазов в костях: достоверное увеличение их уровней зависело от степени поражения скелета (p < 0,02–0,00001), наличия патологического перелома (p < 0,005–0,0001) и выраженности болевого синдрома (p < 0,01–0,00002). Усиление интенсивности процессов костного ремоделирования было связано с достоверным уменьшением показателей общей выживаемости больных РМЖ. Высокодостоверные различия общей 5-летней выживаемости, рассчитанной с учетом пороговых уровней СТХ (0,74 нг/мл) и КЩФ (43,7 Ед/л), были получены для больных РМЖ как с исходными костными метастазами, так и без поражения скелета. СТХ и КЩФ являются биохимическими критериями, имеющими самостоятельное значение в мониторинге и прогнозе метастатического поражения скелета у больных РМЖ.

Ключевые слова: *злокачественные опухоли, метастазы в костях, биохимические маркеры, сыворотка крови, С-концевой телопептид коллагена I типа, костная щелочная фосфатаза, диагностика, мониторинг, прогноз*

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.061–075

Biochemical markers of bone metastasis

N. V. Lyubimova, N. E. Kushlinskiy

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

Bone metastasis is one of the most frequent and dangerous complications of malignant tumors. The last years' achievements in the study of bone remodeling mechanisms promoted the search of sensitive and specific criteria reflecting the intensity of osteolysis and osteosynthesis in bone metastatic lesions. The most informative and clinically valid biochemical markers of bone formation and resorption are characterized in this review. The data on their possible implications in diagnostics, monitoring and prognosis of skeletal lesions by various malignant tumors are presented. The attention to biochemical markers of bone remodeling as noninvasive methods for oncologic patients examination is gradually increasing with adoption of modern laboratory technologies to clinical practice. The last years' publications suggest the possibility of their use both for monitoring, prognosis and early diagnostics of bone metastasis. We present the results of our own investigation of serum C-telopeptide of type I collagen (CTX) as bone resorption marker and bone-specific alkaline phosphatase (BAP) as formation marker in 238 breast cancer patients using ELISA methods. The elevation of studied biochemical parameters in breast cancer patients was significantly associated with the extent of skeletal metastases (p < 0.02–0.00001), pathological fractures (p < 0.005–0.0001) and the severity of pain (p < 0.01–0.00002). Elevated rate of bone turnover was associated with reduced overall survival of breast cancer patients. The significant difference of overall survival estimated on a base of cut-off values of CTX (0.74 ng/ml) and BAP (43.7 IU/L) was found both in the groups of breast cancer patients with and without bone metastases. Serum CTX and BAP are of value in monitoring and predicting the status of breast cancer bone metastases.

Key words: *malignant tumors, bone metastases, biochemical markers, blood serum, C-terminal telopeptide of type I collagen, bone-specific alkaline phosphatase, diagnostics, monitoring, prognosis*

Введение

Метастазирование в кости – частое и опасное осложнение злокачественных опухолей, которое снижает продолжительность и качество жизни пациентов, вызывая сильные боли, патологические переломы, гиперкальциемию и компрессию спинного мозга. Наиболее часто в кости метастазирует рак простаты (54–85 %), рак молочной железы (РМЖ; 47–85 %), рак

щитовидной железы (РЩЖ; 28–60 %), легкого и почки (32–40 %), мочевого пузыря (40–42 %) [1].

Своевременная диагностика метастазов в костях необходима для правильного планирования лечения и оценки прогноза. Используемые в клинической практике инструментальные методы исследования скелета обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью. Так, рентгенография – наиболее распространенный метод диагностики метастазов в костях – позволяет выявлять их поражение только при деминерализации костной ткани на 30–40 %. Более чувствительным методом считают сцинтиграфию, которая обнаруживает деструктивные процессы на ранних стадиях, однако накопление индикатора в местах со сниженной плотностью костной ткани независимо от характера ее изменения делает этот метод весьма неспецифичным.

В последнее время возрос интерес к разработке неинвазивных методов диагностики поражения скелета у онкологических больных, что обусловлено, прежде всего, интенсивными исследованиями патогенеза метастазирования, а также появлением новых подходов в лечении метастазов в кости [2].

Современные представления о костном ремоделировании

Остеокласты. После окончания роста скелет претерпевает процесс обновления костной ткани, который называют ремоделированием. Костное ремоделирование – непрерывный и хорошо скоординированный процесс, который помогает устранить микроповреждения в костном матриксе, возникающие в течение жизни, сохранить архитектуру костей и поддерживать их прочность. В норме в скелете взрослого человека постоянно протекают два связанных и строго сбалансированных процесса: разрушение старой костной ткани остеокластами и формирование нового матрикса остеобластами, берущими начало от предшественников различных клеточных линий: остеобласты – из мезенхимальных стволовых клеток, остеокласты – из макрофагально-моноцитарных клеток костного мозга [3, 4]. При этом резорбция костной ткани предшествует костеобразованию. В процессе репарации кости происходит обновление (без увеличения или потери костной массы) приблизительно 25 % губчатой кости и 3 % кортикальной кости ежегодно [5].

Остеокласты – многоядерные клетки, постоянно образующиеся из макрофагов, основной функцией которых является разрушение костного матрикса путем образования характерных лакун [6]. Созревание, дифференцировка и апоптоз остеокластов контролируются локально цитокинами и системными гормонами, в том числе колониестимулирующим фактором макрофагов и лигандом рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF-κB (RANKL).

Наиболее выраженное влияние на активность остеокластов оказывают кальцитонин, витамин D и локально действующие факторы роста и цитокины (TGF-α, TNFα, TNFβ, IL-1, IL-6) [4]. Известно, что паратиреоидный гормон (ПТГ), кальцитриол и простагландины не оказывают непосредственного действия на остеокласты, а влияют на их образование и дифференцировку именно через увеличение продукции RANKL остеобластами и клетками стромы [7].

Непосредственное действие остеокластов осуществляется за счет секреции в межклеточное пространство, отграниченное клеточной мембраной с одной стороны и минеральной частью кости с другой (резорбционную полость), протеолитических ферментов (тартрат-резистентной кислой фосфатазы (ТРКФ), катепсина K), расщепляющих белки матрикса и соляной кислоты, синтезируемой цитоплазматической карбоангидразой и растворяющей гидроксиапатит. Наиболее важным из ферментов остеокластов, принимающих непосредственное участие в процессах костной резорбции, является ТРКФ, катализирующая реакции гидролиза фосфопротеинов, в частности остеопонтина, остеонектина и костного сиалопротеина.

Значительный прогресс в понимании процессов костного ремоделирования был достигнут с открытием цитокиновой системы RANKL–RANK–OPG, играющей ключевую роль в формировании, дифференцировке и регуляции активности остеокластов [8]. Открытие этой системы стало краеугольным камнем для понимания патогенеза остеопороза, остеокластогенеза и регуляции костной резорбции, а также других процессов, вовлеченных в локальное ремоделирование кости [9]. В систему регуляции остеокластогенеза входит остеопротегерин (OPG) – растворимый рецептор-ловушка RANKL, который, связываясь с лигандом, блокирует его взаимодействие с родственным рецептором, вызывая торможение дифференцировки и активации остеокластов. Все три белка относятся к суперсемейству TNF, играя ключевую роль в образовании и активации остеокластов, а взаимодействие между RANKL и OPG определяет интенсивность остеокластогенеза [4]. Представленные данные подтверждены в экспериментах на животных с нокаутом генов, отвечающих за синтез этих белков. Так, при нарушении продукции OPG развивается остеопороз, а при дефиците RANKL повышается интенсивность процессов костеобразования [10]. Известно, что RANKL связывается со своим рецептором (RANK) на макрофагах и неактивных остеокластах и вызывает активацию и дифференцировку этих клеток, действуя через NF-kβ и N-концевую киназу (JNK) [3, 6, 11].

Некоторые факторы при метастатическом поражении костей могут оказывать двойное влияние на соотношение RANKL/OPG. Такие вещества, как ПТГ-подобный протеин (ПТГпП), IL-1, простагландин E_2, способны стимулировать активность остеокластов в костной строме – как путем усиления действия RANKL, так и за счет снижения уровня OPG [11]. Примечательно, что воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответст-

венных за миграцию, инвазию и метастазирование. Так, была доказана ключевая роль RANKL в нарушении регуляции EMMPRIN/CD47 матриксных металлопротеиназ, ICAM-1, IL-6, IL-8, а также VEGF, индуцирующих развитие очагов остеолиза [12].

Выраженное влияние RANKL и OPG на дифференцировку остеокластов открывает перспективы для исследования возможности использования антител к RANKL и рекомбинантных генов OPG для лечения заболеваний скелета, сопровождающихся усилением остеолиза, в том числе его метастатического поражения. При этом для оценки действия ингибиторов остеокластов полезна оценка фармакодинамики маркеров костной резорбции, таких как NTX, повышенные уровни которого ассоциируются с высоким риском метастазирования в кости и более высоким уровнем смертности пациентов [13]. Одним из первых антагонистов RANKL является рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen), эффект которого впервые продемонстрирован на пациентах с множественной миеломой и РМЖ, осложненным поражением костей. В ходе терапии отмечали снижение уровней биомаркеров резорбции (включая uNTX/Cr), однако клиническое использование Fc-OPG так и не получило развития из-за сравнительно короткого периода полураспада препарата и возможного риска активации иммунного ответа на эндогенный OPG [14]. Разработан и апробирован другой препарат OPG – CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование также не увенчалось успехом [15]. Антитела к RANKL – ALX-0141 (Ablynx) протестированы в клиническом исследовании I фазы на здоровых женщинах в постменопаузе [16]. Генуинные человеческие антитела к RANKL – AMG 162 (Denosumab), обладающие высокой селективностью к человеческому RANKL, в ходе клинического исследования I фазы приводили к снижению экскреции маркера костной резорбции NTX и не вызывали серьезных побочных эффектов. Исследования II фазы препарата Denosumab показали эффективность и безопасность его применения у больных РМЖ, осложненным поражением костей, а также при костных метастазах рака простаты и множественной миеломе [17].

Остеобласты. За стадией резорбции костной ткани в норме всегда следуют процессы костеобразования, осуществляемые остеобластами, образующимися из мезенхимальных стволовых клеток. Основным фактором, от которого зависит дифференцировка остеобластов, является транскрипция CBFA1 (core-binding factor α1). Механизмы дифференцировки остеобластов изучены недостаточно, однако известно, что молодые клетки синтезируют главным образом костную щелочную фосфатазу (КЩФ), в то время как зрелые клетки синтезируют остеокальцин и осуществляют процессы кальцификации, превращаясь в остеоциты. Рост и дифференцировку остеобластов также способны стимулировать PlGF, FGF-β и TGF-β.

Закономерности биохимических нарушений костного метаболизма при метастазировании в кости

Костные метастазы по характеру деструкции ткани разделяют на литические и пластические. Наличие выраженной взаимосвязи между процессами остеолиза и костеобразования в норме и при патологических процессах в костях позволяет рассматривать любое метастатическое поражение как смешанное с преобладанием литического или пластического компонента. Наиболее выраженные процессы остеолиза наблюдаются при поражении скелета клетками РМЖ и при множественной миеломе, напротив, при метастазировании рака простаты преобладают пластические процессы.

Существует несколько современных представлений о механизмах костной деструкции при злокачественных процессах. В более ранних работах основное внимание уделяли непосредственному разрушающему воздействию злокачественных клеток на костную ткань в результате секреции высокоактивных протеолитических ферментов, включая коллагеназы. Однако очевидно, что местное деструктивное действие раковых клеток не может проявляться на ранних стадиях развития опухолей, поскольку их проникновение в костную ткань представляет собой многоступенчатый, длительный и сложный процесс. Научные достижения последнего десятилетия способствовали пониманию механизмов костного ремоделирования в норме и возможных путей его нарушения при злокачественном росте. Так, в настоящее время одним из главных механизмов метастатической деструкции костей признается активация остеокластов в результате системного действия на них паракринных факторов, продуцируемых злокачественными клетками (TGF-β, PlGF, IGF-I, IGF-II, FGF, VEGF) [18, 19]. Работами разных авторов доказано, что стимулирование остеокластогенеза осуществляется опухолевыми клетками и зависит от вида опухоли [6, 20]. Так, при множественной миеломе скопления остеокластов наблюдают только в участках костной ткани, контактирующих с опухолевыми клетками, что сопровождается выраженным преобладанием литических процессов. Идентифицированы факторы, стимулирующие активацию и дифференцировку остеокластов при множественной миеломе (IL-1, IL-6, воспалительный белок макрофагов, RANKL) [21]. IL-1 – мощный стимулятор формирования остеокластов, однако существенного увеличения его экспрессии в очагах миеломы не обнаружено. В то же время IL-6 – мощный стимулятор дифференцировки остеокластов, он блокирует апоптоз клеток миеломы и присутствует в повышенных количествах в сыворотке крови пациентов. По мнению большинства исследователей, главным фактором, стимулирующим формирование и дифференцировку остеокластов, считают RANKL, продуцируемый клетками миеломы [22]. Это предположение подтверждено R. N. Pearse et al. [23], показавшими достоверное снижение OPG и увеличение RANKL в микроокружении клеток миеломы.

В экспериментах данное наблюдение подтвердилось – отмечено повышение интенсивности резорбции костной ткани у животных с миеломной болезнью в результате блокирования OPG и ее увеличение при нарушении взаимодействия RANKL с рецептором RANK. Еще одним мощным индуктором резорбции при множественной миеломе считают воспалительный белок макрофагов, а некоторые исследователи отводят ключевую роль именно ему [24]. У больных этот белок синтезируют около 70 % клеток миеломы, а в экспериментальных исследованиях в клетках миеломы наблюдается активация гена, ответственного за синтез воспалительного белка макрофагов [25]. У мышей, лишенных данного гена, наблюдали выраженное снижение интенсивности костной резорбции при множественной миеломе. Воспалительный белок макрофагов также усиливает адгезивные взаимодействия опухолевых клеток с клетками стромы, способствуя дальнейшему увеличению его продукции, а также повышению синтеза RANKL и IL-6, что приводит к прогрессированию остеолиза и опухолевого роста [24, 26].

Столь выраженная активность процессов резорбции и практически полное отсутствие костеобразования при множественной миеломе предполагают продукцию клетками белковых факторов, не только стимулирующих остеокласты, но и вызывающих нарушение действия остеобластов. Возможно, таким белком является dickkopf-1 (DKK-1) [27] – один из белковых факторов сигнального пути Wnt, отвечающего за дифференцировку остеобластов [28]. Данный сигнальный путь включает большую группу белков и ядерных рецепторов, основным из которых является рецептор липопротеина низкой плотности (LRP5). В результате взаимодействия с этим рецептором сигнального белка Wnt происходит активация β-катенина, стимулирующего остеобластогенез. DKK-1 способен связывать рецепторы сигнального пути Wnt и блокировать дифференцировку и пролиферацию остеобластов. Использование антител к DKK-1 у экспериментальных животных с множественной миеломой уменьшало интенсивность резорбции и стимулировало остеосинтез [27]. Некоторые исследователи отметили значительное увеличение концентрации DKK-1 у больных множественной миеломой [29], раком легкого, пищевода, простаты, РМЖ с метастазами в костях [30, 31]. Перспективы изучения механизмов сигнального пути Wnt связаны с поиском новых таргетных препаратов и маркеров костного ремоделирования.

Другим важным аспектом патогенеза остеолиза при множественной миеломе является снижение функциональной компетенции остеобластов, доказанное при морфометрическом исследовании биопсийного материала нормальной костной ткани и очагов деструкции. Аналогичные закономерности отмечены при опухолях различного гистогенеза, включая РМЖ, РЩЖ, рак легкого и некоторые другие опухоли, способные продуцировать и секретировать в кровь цитокины, факторы роста и ряд биологически активных соединений, которые оказывают стимулирующий эффект на остеокласты. G. R. Mundy et al. на основании собственных и обобщенных литературных данных указывают на критическую для развития и прогрессии костных метастазов роль таких цитокинов, как IL-1, IL-6, а также факторов роста (EGF, TGF-β, TGF-α, PlGF) и простагландинов, которые, с одной стороны, проявляют активирующее действие на остеокласты, а с другой – ингибирующее действие на остеобласты [32]. Со времени выделения в 1987 г. из клеток рака легкого специфического белка, обладающего активностью ПТГ и получившего название ПТГпП, эктопической продукции раковыми клетками этого белка придается особое значение в развитии остеолиза и гиперкальциемии, сопровождающей деструкцию костной ткани [33]. При иммуногистохимических исследованиях установлена экспрессия ПТГпП в разных типах плоскоклеточного рака, рака легкого, почки, РМЖ, при этом с максимальной частотой ПТГпП экспрессируется именно в клетках костных метастазов. Уровень ПТГпП и выраженность его экспрессии в злокачественных клетках предложено использовать в качестве фактора прогноза метастазирования опухолей в кости с последующим формированием групп риска для проведения профилактического лечения [33]. Таким образом, наиболее распространенный остеолитический характер поражения скелета реализуется при нарушении баланса между процессами резорбции и формирования костной ткани, которое возникает в результате активации или увеличения количества остеокластов, а также при снижении количества или функциональной компетенции остеобластов.

В то же время некоторые опухоли могут секретировать факторы, оказывающие системное действие на остеобласты, вызывая их образование или активацию. В клинике эти данные пока не подтверждены, однако в эксперименте получены прямые и косвенные доказательства способности некоторых типов раковых клеток, в частности клеток рака простаты, продуцировать TGF-β и PlGF, фрагменты урокиназы, обладающие стимулирующим эффектом на пролиферацию и активность остеобластов. Получены данные, свидетельствующие о способности клеток РМЖ секретировать факторы, стимулирующие остеобласты [32]. Стало быть, в развитии остеосклероза важную роль могут играть паракринные факторы, усиливающие костеобразование, хотя до последнего времени общепринятым считали механизм усиления формирования костной ткани в ответ на интенсивную резорбцию.

Гиперкальциемия. Одним из наиболее важных признаков, сопровождающих поражение скелета и существенно ухудшающих прогноз, является гиперкальциемия, обнаруживаемая у 10–30 % онкологических больных. Гиперкальциемию можно наблюдать не только у больных с клиническими признаками поражения скелета, но и при отсутствии таковых, что обознача-

ется как гуморальная гиперкальциемия злокачественного роста. Одним из главных механизмов гуморальной гиперкальциемии, которую наиболее часто обнаруживают при раке легкого, мочевого пузыря, РМЖ, считают секрецию злокачественными клетками вышеописанных биологически активных факторов, способных оказывать прямое или косвенное влияние на костное ремоделирование и минеральный гомеостаз. Однако гиперкальциемию в редких случаях можно наблюдать и у больных с бластическим типом метастазов, что отражает сложность патогенетических механизмов костной деструкции при злокачественных опухолях.

Бисфосфонаты. В настоящее время наиболее эффективными препаратами, снижающими интенсивность резорбции и потерю костной массы при заболеваниях скелета различной этиологии, считают бисфосфонаты. Механизм действия бисфосфонатов основан на их способности ингибировать активность остеокластов, а также снижать интенсивность процессов кальцификации при депонировании препарата, обладающего высоким сродством к гидроксиапатиту в минеральной части костного матрикса. В настоящее время бисфосфонаты (памидронат, клодронат, ибандронат) широко используют в клинической практике при заболеваниях скелета метаболического характера, а также применяют при лечении костных метастазов [34].

Биохимические маркеры костного ремоделирования

Достижения последних лет в изучении молекулярных механизмов костного ремоделирования способствовали поиску чувствительных и специфичных критериев, отражающих интенсивность процессов резорбции и формирования костной ткани. Наиболее информативные из них, получившие внедрение в клиническую практику в качестве маркеров формирования и резорбции костной ткани при заболеваниях скелета, представлены в табл. 1.

Маркеры формирования костной ткани

ЩФ (КФ 3.1.3.1) – маркер, широко используемый в клинической практике. Функционально активный фермент в клетке имеет структуру тетрамера, прикрепленного к клеточной мембране С-концевым углеводным фрагментом, содержащим фосфатидилинозитол. Специфичность структуры тетрамеров обеспечивает связь фермента с наружной поверхностью клеточной мембраны, что, в свою очередь, делает их доступными для воздействия фосфолипаз С и D. Полагают, что именно благодаря действию этих ферментов ЩФ присутствует в сыворотке крови в виде димера. ЩФ отщепляет неорганический фосфор от органического фосфата, способствуя образованию фосфата кальция и последующей минерализации костной ткани, а так-

Таблица 1. *Основные биохимические маркеры метаболизма костной ткани*

Маркеры	Тканевое происхождение	Материал	Методы определения
Маркеры костеобразования			
Общая активность щелочной фосфатазы (ЩФ) (AP)	Костная ткань, печень, почки, кишечник	Кровь	Колориметрия
Костный изофермент ЩФ (BAP)	Костная ткань	Кровь	Иммуноферментный анализ (ИФА), преципитация с лектином, электрофорез
Остеокальцин (BGP)	Костная ткань, тромбоциты	Кровь	ИФА, радиоиммунный анализ (РИА)
Проколлагеновые пропептиды: С-концевой пропептид (PICP) N-концевой пропептид (PINP)	 Костная ткань, мягкие ткани, кожа Костная ткань, мягкие ткани, кожа	Кровь	ИФА, РИА
Маркеры резорбции костной ткани			
Гидроксипролин (OHP)	Костная ткань, хрящевая ткань, мягкие ткани, кожа, кровь	Моча	Колориметрия, РИА, жидкостная хроматография высокого разрешения (ЖХВР)
Галактозилгидроксилизин	Костная ткань, мягкие ткани, кожа	Моча	ЖХВР
Пиридиновые связи коллагена: пиридинолин (PYD) дезоксипиридинолин (DPD)	 Костная и хрящевая ткань, связки, сосуды Костная ткань, дентин	Моча	ЖХВР, ИФА, РИА
Коллагеновые пептиды: С-концевой телопептид (ICTP, CTX, CrossLaps) N-концевой телопептид (NTP, NTX)	 Костная ткань, кожа Костная ткань, кожа	 Кровь, моча Моча	 РИА, ИФА ИФА
ТРКФ (TRAP)	Костная ткань, кровь	Кровь	Колориметрия, ИФА

Примечание. *В скобках указаны международные аббревиатуры.*

же расщепляет пирофосфат – потенциальный ингибитор минерализации.

ЩФ представляет собой семейство ферментов, отличительным свойством которых является органная специфичность. Синтез изоферментов ЩФ кодируется четырьмя структурными генами с преобладающей экспрессией тканево-неспецифического гена, который кодирует костный, печеночный и почечный изоферменты одновременно. Синтез кишечной и плацентарной фосфатаз кодируют отдельные гены, экспрессирующиеся преимущественно в соответствующих тканях – тонком кишечнике и плаценте. Помимо истинных изоферментов имеются варианты ЩФ, появление которых обусловлено разными модификациями. В тканях и соответственно в сыворотке крови при злокачественных новообразованиях обнаруживают также изоферменты – продукты экспрессии генов, которые кодируют синтез ферментов в эмбриональном периоде [35].

Кодирование печеночного и костного изоферментов одним и тем же геном обеспечивает их сходство, тогда как различия в величине заряда, электрофоретической подвижности, термолабильности, чувствительности к действию активаторов и ингибиторов изоферменты приобретают в результате модификаций на посттрансляционном уровне, в частности вследствие разной степени гликозилирования и сиалирования их молекул [35, 36].

Одним из важных научных фактов, способствующих внедрению КЩФ в клиническую практику, было доказательство того, что изофермент синтезируется остеобластами и его активность в сыворотке крови коррелирует с образованием коллагена, т. е. отражает интенсивность костеобразования на клеточном уровне. В настоящее время общепринятым механизмом фосфатаземии является продукция активированными остеобластами КЩФ с последующей ее секрецией в кровь в процессе формирования и дифференцировки костного матрикса [37]. Экспрессия костного изофермента регулируется многими факторами, включая ПТГ, витамин D, глюкокортикоиды и факторы роста.

В норме костный и печеночный изоферменты – доминирующие фракции, относительное содержание костного изофермента в сыворотке крови составляет 30–50 % от общей активности ЩФ. Несмотря на большой период полураспада (24–48 ч) в сыворотке крови, для костной фракции характерна суточная вариабельность с пиком активности в ночное время. Выводится изофермент в основном печенью, нарушение функции которой в некоторых случаях (первичный билиарный цирроз) приводит к гиперферментемии.

В последние годы в клиническую практику активно внедряют высокочувствительные иммуноферментные методы определения активности КЩФ, применение которых стало возможным после получения высокоспецифичных моноклональных антител.

Остеокальцин – основной неколлагеновый белок костного матрикса, состоящий из 49 аминокислотных остатков, продуцируется исключительно остеобластами, его относительное содержание в костной ткани составляет 1–2 % от общего белка; идентифицирован C. P. Price в 1980 г. [38]. Остеокальцин рассматривают в качестве одного из наиболее специфичных маркеров активности остеобластов. В молекуле остеокальцина присутствуют три остатка глутаминовой кислоты, которые посредством витамин-K-зависимого процесса карбоксилируются и приобретают таким образом высокое сродство к гидроксиапатиту. В связанной с гидроксиапатитом форме остеокальцин встраивается во внеклеточный матрикс костной ткани. Небольшая часть белка, не включенного в костный матрикс, поступает в циркуляторное русло и может быть определена в сыворотке крови в виде интактной молекулы. Однако в сыворотке крови обнаруживают также фрагменты остеокальцина, которые представляют собой продукт деградации костного матрикса.

Физиологическая роль остеокальцина до конца не определена. Есть предположения об участии белка в процессах минерализации как мессенджера витамина D. Остеокальцин ингибирует преципитацию гидроксиапатита и способен путем хемотаксиса привлекать клетки-предшественники остеокластов, способствуя тем самым замедлению процессов резорбции. Установлено, что экспрессия остеокальцина регулируется различными гормонами и факторами роста, в частности витаминами K и D, тиреоидными гормонами, инсулином, эстрогенами, активирующими синтез белка, тогда как информация о влиянии ПТГ и кальцитонина неоднозначна.

Несмотря на то, что остеокальцин и КЩФ продуцируются остеобластами и в определенной степени отражают их активность, маркеры различаются по своей экспрессии, которая проявляется на разных этапах развития остеобластов, в связи с чем между ними не всегда наблюдается корреляционная зависимость.

Методы определения остеокальцина разработаны на основе моно- или поликлональных антител, обладают перекрестной активностью, и в этом отношении дифференцированный анализ интактного пептида или его фрагментов пока затруднен, что ограничивает его использование как маркера остеосинтеза в клинической практике.

Проколлагеновые пропептиды. Коллаген I типа синтезируется остеобластами в виде проколлагена I типа, который содержит дополнительные последовательности на обоих концах молекул-предшественников (PINP и PICP), характеристика которых представлена в табл. 1. Процессу формирования коллагеновых фибрилл предшествует отщепление концевых пропептидов под воздействием специфических протеаз, которые затем поступают в циркуляторное русло в количествах, эквимолярных коллагену, включаемому на последующих этапах костеобразования в костный матрикс. Проколлагеновые пропептиды идентифицированы более 30 лет назад с последующим выделением специ-

фических моноклональных антител к ним, что сделало доступным их определение при использовании ИФА или РИА. Выраженная физиологическая вариабельность ограничивает применение PICP в клинической практике в качестве критерия интенсивности синтеза коллагена I типа.

Маркеры резорбции костной ткани

Гидроксипролин – незаменимая аминокислота, которая входит в состав коллагена разных типов. Ее высокое содержание (около 13 %) обеспечивает в определенной степени стабильность коллагеновых фибрилл. В процессе деградации коллагена гидроксипролин поступает в кровь в виде свободной формы, на долю которой приходится около 90 % от общего гидроксипролина, а также в связанной с поли- и олигопептидами форме. Из-за низкой молекулярной массы свободный гидроксипролин фильтруется с мочой, затем практически полностью (90 %) реабсорбируется в почечных канальцах и в последующем метаболизируется в печени, тогда как пептид-связанные формы и не абсорбировавшийся свободный гидроксипролин (10 %) экскретируются с мочой.

До последнего времени гидроксипролин мочи наряду с другими биохимическими показателями использовали в клинической практике в качестве критерия резорбции костной ткани. Между тем иммуногистохимические исследования костной ткани подтвердили отсутствие корреляции между экскрецией гидроксипролина и объективными признаками костной резорбции. Низкая специфичность гидроксипролина в связи с его распространенностью практически во всех типах соединительной ткани, а также способностью реутилизироваться в процессе синтеза коллагена обусловили поиск более специфичных маркеров резорбции костной ткани.

Пиридиновые связи коллагена. При исследовании структуры коллагена показано, что стабильность коллагенового матрикса обеспечивают межмолекулярные необратимые связи, образующиеся между незаменимыми аминокислотами (лизином и гидроксилизином), входящими в полипептидную цепь коллагена I типа. Перекрестные связи возникают между концевой (представленной N- или C-телопептидом) и спиралевидной частями пептидных молекул коллагена в процессе формирования коллагеновых фибрилл, а их общей особенностью является наличие пиридинового кольца, что обусловило их наименования: PYD и DPD. Последующий анализ показал, что PYD и DPD присутствуют только во внеклеточных коллагеновых фибриллах, характерны для дифференцированного матрикса прочных типов соединительной ткани – кости, дентина, сухожилий, хряща и не обнаруживаются в коллагене кожи, мягких тканях, чем выгодно отличаются от гидроксипролина.

Костная ткань – основной источник PYD биологических жидкостей организма. В количественном отношении PYD как межмолекулярная связь коллагеновых молекул преобладает в хрящевой ткани, сухожилиях, связках, однако активный метаболизм костной ткани по сравнению с другими типами соединительной ткани давал многим исследователям основание считать, что определяемый в моче PYD образуется преимущественно за счет костной деструкции физиологического или патологического характера [39].

DPD более специфичен для костной ткани, поскольку обнаруживается практически исключительно в костях. Соотношение PYD: DPD, которое в коллагене костной ткани составляет 4:1, сохраняется в моче взрослых, в которой на долю DPD приходится около 20 % от общего уровня экскреции пиридиновых связей коллагена, что является еще одним доказательством специфичности обоих пиридиновых аналогов для костной ткани [40].

PYD и DPD – стабильные структуры, не подверженные деградации в процессе резорбции коллагена костного матрикса. Они поступают в циркуляторное русло в составе пептидных фрагментов и практически полностью экскретируются с мочой в виде свободной (40 %), а также связанной с пептидами или гликозилированной (60 %) форм. В отличие от гидроксипролина, который может реутилизироваться в процессе синтеза коллагена, PYD и DPD не метаболизируются в печени и не вовлекаются в эти процессы, что обеспечивает их высокую специфичность и чувствительность как критериев костной резорбции.

В количественном отношении PYD и DPD – минорные компоненты коллагена I типа, поэтому их идентификация стала возможной только благодаря природной флуоресценции пиридина, входящего в состав обоих аналогов. Измерение флуоресценции с методической точки зрения характеризуется высокой чувствительностью, а важнейшим из методов уже более 20 лет остается ЖХВР. Одним из преимуществ метода является то, что ЖХВР дает возможность определять как свободные, так и гликозилированные и пептид-связанные фракции PYD и DPD, что соответствует их общей экскреции, наиболее полно отражающей костную резорбцию [41]. Возможно определение PYD и DPD на основе ИФА [41].

При изучении закономерностей экскреции PYD и DPD обнаружена ее возрастная зависимость. Период роста и увеличения костной массы у детей характеризуется значительным усилением и вариабельностью экскреции PYD и DPD, которая постепенно снижается до уровня среднестатистической нормы при достижении индивидуального пика костной массы к 30 годам [42]. Наблюдали тенденцию к повышению уровней PYD и DPD в моче после 50–60 лет как у мужчин, так и у женщин, у последних она выражена сильнее. Существует индивидуальная и суточная вариабельность экскреции PYD и DPD, выражающаяся, в частности, в ее снижении в ночные и усилении в утренние часы, однако при исследовании порционной и 24-часовой

мочи установлена высокая корреляционная зависимость результатов при их пересчете на концентрацию креатинина мочи [43]. Снижение вариабельности достигается при стандартизации режима сбора и анализа мочи, в частности при исследовании второй утренней порции мочи (от 8 до 10 ч), а также при нормализации измеренных уровней PYD и DPD по отношению к концентрации креатинина анализируемой порции мочи.

Коллагеновые пептиды. Наряду с PYD и DPD в составе фрагментов коллагена, экскретирующихся с мочой в виде продуктов деградации костного матрикса, идентифицированы также пептидные компоненты, которые привлекли внимание исследователей как потенциальные критерии костной резорбции.

В табл. 1 представлена информация о CTX и NTX, которые можно обнаруживать в моче как независимо, так и в комплексе с PYD или DPD, что не влияет на их детекцию. К обоим типам телопептидов выделены поли- и моноклональные антитела, на основе которых разработаны тест-системы, и стало возможным определение С-концевого телопептида в сыворотке крови (ICTP, CTX) и моче (CTX, Cross Laps) [44] и N-телопептида (NTX, NTP) в моче [45].

ТРКФ (КФ 3.1.3.2) относится к гидролазам, проявляющим свои свойства по отношению к фосфомоноэфирам ортофосфата в кислой среде. Фермент гетерогенен по составу и представлен шестью различающимися по своей структуре изоформами, две из которых продуцируются остеокластами. В соответствии с особенностями внутриклеточного распределения изофермент с большей молекулярной массой (100 кДа) локализуется в лизосомах, тогда как изоформа с молекулярной массой 34 кДа – в гофрированной каемке остеокластов. Этот изофермент отличается от других изоформ устойчивостью к ингибирующему действию тартрата (см. табл. 1).

В процессе костной резорбции ТРКФ выделяется из гофрированной каемки остеокластов в резорбционную полость, где проявляет свои гидролитические свойства. В связи с этим представлялось, что высокая активность ТРКФ в сыворотке крови должна отражать усиление интенсивности резорбции костной ткани. Однако в связи со сложностью молекулярных механизмов костного ремоделирования ТРКФ регулируется различными факторами, в частности, ПТГ стимулирует, а кальцитонин ингибирует продукцию фермента остеокластами. Требуются также специфические условия для проявления ферментативной активности, регуляция которых сложна. Кроме того, существуют методические проблемы, затрудняющие определение ТРКФ (в частности нестабильность фермента и присутствие в сыворотке крови его ингибиторов). После разработки тест-систем на основе ИФА появилась возможность определения ТРКФ в сыворотке крови, однако однозначных данных по клиническому использованию данного фермента как критерия резорбции костной ткани не представлено.

Клиническое значение биохимических маркеров костной резорбции при заболеваниях скелета различной этиологии

PYD и DPD – наиболее информативные маркеры костной резорбции, а первые результаты исследования PYD в качестве критерия костной резорбции опубликованы S. P. Robins et al. в 1986 г. [39]. В серии последующих клинических работ представлены данные о возможном их использовании в диагностике и мониторинге заболеваний скелета метаболического характера [40]. Повышенные уровни PYD и DPD в моче по сравнению с их экскрецией в норме обнаружены при гиперпаратиреозе, остеомаляции и остеопорозе, болезни Педжета.

В последние годы опубликованы результаты кооперированных исследований, свидетельствующие об усилении экскреции PYD и DPD с возрастом, наиболее выраженном у женщин в постменопаузе, что связывают с дефицитом половых гормонов [41]. Потеря костной массы в норме составляет у женщин 0,75–2,4 %, у мужчин – 0,4–1,2 % в год. Пожилой возраст и женский пол являются факторами риска возникновения остеопороза, поскольку у женщин пиковая костная масса на 30–50 % ниже, чем у мужчин, а ежегодная скорость ее потери выше [46].

При исследованиях маркеров костной резорбции у больных остеопорозом установлена зависимость уровней PYD и DPD от степени снижения минеральной плотности костной ткани (МПКТ) при ее измерении на основе двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии. Представлены убедительные доказательства возможности использования PYD и DPD мочи в качестве маркеров эффективности лечения остеопороза, основанные на достоверном снижении их уровней при положительном эффекте гормональной заместительной терапии и лечении бисфосфонатами [40, 43].

Ранее предпринимались попытки использования показателей экскреции общего и ионизированного кальция с одновременным определением кальция сыворотки крови и гидроксипролина мочи в целях диагностики и оценки эффективности лечения костных метастазов, однако практического применения эти биохимические показатели не получили.

Первые клинические исследования PYD и DPD в качестве маркеров костного метастазирования опубликованы до 1993 г., в них высказано предположение о возможном использовании этих показателей в мониторинге поражения скелета у онкологических больных. Авторы выявили достоверное увеличение общей экскреции PYD и DPD у больных раком простаты и РМЖ с поражением скелета по сравнению с больными без клинических признаков костных метастазов и контролем. Этот факт позволил исследователям сделать вывод об усилении костной резорбции при бластическом характере поражения скелета.

По данным J. J. Body et al., усиление общей экскреции PYD и DPD наблюдали у всех обследованных

больных РМЖ с метастазами в костях по сравнению с практически здоровыми женщинами [47]. В то же время увеличение в моче таких показателей, как кальций, гидроксипролин, CTX, обнаруживали не у всех пациенток (соответственно в 47, 74 и 83 % наблюдений).

Для оценки значимости PYD и DPD в качестве маркеров костных метастазов при различном характере поражения скелета нами предпринято исследование их экскреции при использовании ЖХВР и ИФА у 271 онкологического больного с метастазами в костях, из них 180 больных РМЖ, 41 – раком простаты, 21 – раком легкого и 29 – множественной миеломой, а также 94 онкологических больных без клинических признаков поражения скелета.

Суммируя полученные данные [48, 49], следует отметить одинаковую направленность выявленных изменений при первичных опухолях различной локализации. Общая экскреция с мочой PYD и DPD была существенно (более чем в 2,5 раза) повышена у больных с метастазами в костях при РМЖ, раке легкого, простаты, а также при множественной миеломе по сравнению с нормой и онкологическими больными без клинических признаков костных метастазов. С наибольшей частотой повышенные по отношению к верхней границе нормы значения PYD и DPD обнаруживались при раке легкого (92,3 % для обоих маркеров), РМЖ (95,5 и 73,6 % соответственно) и множественной миеломе (100 и 54,6 % соответственно), при которых поражение костей имеет, как известно, преимущественно литический характер. Больные раком простаты имели повышенные уровни PYD и DPD в 75,6 и 65,9 % наблюдений соответственно. Полученные данные представляют особый интерес с точки зрения общепринятого в клинической практике деления костных метастазов на литические и бластические в соответствии с типом первичной опухоли и свидетельствуют о наличии выраженной резорбции костной ткани у онкологических больных с метастазами в костях независимо от локализации злокачественного процесса.

Следует отметить, что результаты определения PYD и DPD в моче онкологических больных без метастатического поражения скелета весьма противоречивы. Так, некоторые авторы отмечают отсутствие достоверных различий в их экскреции у онкологических больных без метастазов в кости и практически здоровых людей [50]. В то же время в ряде работ обнаружено достоверное усиление экскреции PYD и DPD по сравнению с нормой не только при метастазах в костях, но и у больных без признаков метастатического поражения скелета [51, 52]. При этом в качестве одного из предполагаемых механизмов усиления экскреции пиридиновых связей коллагена у больных без метастазов в костях авторы рассматривают стимуляцию костной резорбции в результате локального или системного воздействия факторов, продуцируемых некоторыми типами злокачественных опухолей. Однако необходимо учитывать тот факт, что, несмотря на отсутствие клинических признаков метастазов, поражение скелета у таких больных исключить нельзя в связи с существующими трудностями ранней диагностики метастазирования в кости при использовании инструментальных методов.

В выполненном нами исследовании подтверждением этого предположения были больные раком легкого, простаты и РМЖ (15 %), у которых первыми признаками поражения скелета были высокие уровни PYD и DPD, опережавшие данные рентгенографии на 6–12 мес, что позволяет рассматривать эти показатели в качестве ранних биохимических критериев костных метастазов.

В настоящее время имеется значительная теоретическая и методическая база для разработки и испытания новых подходов в лечении и профилактике костных метастазов, что требует внедрения в клиническую практику неинвазивных чувствительных критериев костного метаболизма, позволяющих оценивать состояние скелета и эффективность терапии. Так, анализ результатов серийного исследования PYD и DPD в моче больных РМЖ с метастазами в костях, получавших лечение памидронатом, показал возможность использования этих показателей для оценки эффективности лечения бисфосфонатами, поскольку уже через 7 дней после первого введения препарата наблюдали снижение экскреции обоих аналогов [47]. Снижение экскреции PYD и DPD положительно коррелировало с эффективным лечением, в отличие от гидроксипролина в моче и кальция в сыворотке крови, и наблюдалось в довольно ранние сроки, отражая уменьшение интенсивности костной резорбции [53]. Возможность применения экскреции PYD и DPD для наблюдения за эффективностью лечения подтверждена нами у больных РМЖ с метастазами в костях, получавших ибандронат. Для больных с положительным эффектом лечения характерно снижение уровней PYD и DPD в моче на 44–64 % уже через 3–6 мес от начала терапии. При отрицательной динамике, выражавшейся в появлении новых метастазов и отсутствии данных за репарацию остеолитических очагов, продолжалось повышение экскреции пиридиновых связей коллагена [48].

Среди других современных маркеров костного ремоделирования большое внимание исследователей привлекают CTX и NTX, экскретирующиеся, так же как PYD и DPD, в составе коллагеновых фрагментов при деструкции костного матрикса [2]. В большинстве работ продемонстрирована прямая корреляция результатов определения PYD и DPD с телопептидами по данным ИФА [50]. При этом PYD и DPD проявляли большую чувствительность и специфичность как в диагностике, так и в оценке эффективности лечения метастазов. Позже появились публикации, которые продемонстрировали возможность применения маркеров костной резорбции (ТРКФ, DPD, CTX, NTX) не только в диагностике, но и в мониторинге пораже-

ния скелета [47, 54, 55]. При этом во многих наблюдениях авторы высказали мнение, что CTX характеризуется большей чувствительностью по сравнению с NTX как маркер диагностики и мониторинга костного метастазирования.

Нами выполнено сравнительное исследование CTX на основе данных ИФА в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях и без поражения скелета, а также практически здоровых женщин. В контрольной группе максимальные значения CTX достигали 0,76 нг/мл и соответствовали общепринятой норме данного маркера костной резорбции (< 0,8 нг/мл) (табл. 2). У большинства женщин этой группы – 42 (89,4 %) из 47 – преобладали значения показателя в интервале до 0,6 нг/мл. У 5 (10,6 %) из 47 женщин значения CTX были несколько выше (0,6–0,76 нг/мл), что можно связать с постменопаузой от 3 до 5 лет у этих женщин. По результатам определения CTX в сыворотке крови практически здоровых женщин рассчитано пороговое значение маркера, равное 0,74 нг/мл, соответствующее 95 % доверительному интервалу.

Таблица 2. *Уровни CTX в сыворотке крови больных РМЖ и практически здоровых женщин*

Группы	Число женщин	Уровень CTX (нг/мл)	
		медиана (квартили)	среднее ± SD (интервалы)
Контрольная[1]	47	0,34 (0,22–0,44)	0,33 ± 0,15 (0,01–0,76)
Больные РМЖ без метастазов в костях[2]	167	0,41 (0,27–0,52)	0,43 ± 0,21 (0,11–1,13)
Больные РМЖ с метастазами в костях[3]	71	0,92 (0,65–1,31)	1,12 ± 0,72 (0,21–3,52)

Примечание. $p_{1-2} = 0,004$; $p_{1-3} = 0,000001$; $p_{2-3} = 0,000001$.

Результаты определения CTX в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях при первичном обследовании выявили высокодостоверное ($p = 0,000001$) повышение как медиан (0,92 и 0,41 нг/мл), так и средних уровней (1,12 и 0,43 нг/мл) маркера остеолиза по сравнению с больными без метастазов (см. табл. 2). При этом для больных анализируемых групп максимальные уровни CTX существенно превышали показатель нормы [56].

В последнее время усилился интерес к прогностической значимости пептидных фрагментов коллагена I типа (ICTP) как маркеров остеолиза при поражении скелета злокачественными опухолями. Так, при исследовании ICTP в сыворотке крови 40 больных раком простаты с поражением скелета наиболее выраженное увеличение телопептида обнаружили у 17 больных со смешанными метастазами в костях с худшим прогнозом по сравнению с 23 больными с бластическими метастазами, у которых отмечена лучшая выживаемость [57].

Установлена корреляция между исходными уровнями NTX и развитием скелетных осложнений у онкологических больных [58], а высокие уровни NTX ассоциированы с неблагоприятным прогнозом и короткой выживаемостью [59].

Показано, что уровень CTX в моче отражает интенсивность остеолиза и определяет прогноз у больных РМЖ с метастазами в костях [60]. Нами проанализирована взаимосвязь результатов определения CTX в сыворотке крови больных РМЖ с клиническими проявлениями метастазов в костях (табл. 3). Установлено статистически достоверное увеличение уровней сывороточного CTX у больных при множественных метастазах по сравнению с единичными очагами поражения. Наличие патологического перелома – важная клиническая характеристика выраженности остеолиза у больных РМЖ при поражении скелета. Полученные нами данные по исследованию CTX выявили высокодостоверное повышение уровня маркера в крови больных с патологическим переломом по сравнению с соответствующим показателем при его отсутствии. Обнаружено достоверное увеличение маркера в группах пациенток с сильной болью, получавших наркотические анальгетики, по сравнению с пациентками с умеренной болью, принимавшими нестероидные противовоспалительные соединения.

Таблица 3. *Уровни CTX у больных РМЖ в зависимости от клинических характеристик метастатического процесса*

Критерий	Медиана (квартили)	Среднее ± SD (интервал)	*p*
Распространенность поражения скелета			
Множественные метастазы	1,29 (1,01–1,86)	1,5 ± 0,79 (0,67–3,52)	0,00001
Единичные метастазы	0,64 (0,54–0,75)	0,66 ± 0,2 (0,21–1,17)	
Патологический перелом			
Наличие	1,24 (0,92–1,6)	1,46 ± 0,79 (0,67–3,52)	0,0001
Отсутствие	0,63 (0,54-0,71)	0,67 ± 0,21 (0,21–1,17)	
Болевой синдром			
Сильный	1,3 (1,01–1,87)	1,54 ± 0,8 (0,69–3,52)	0,00002
Умеренный	0,65 (0,54–0,76)	0,69 ± 0,25 (0,21–1,58)	

Оценку прогностического значения CTX проводили с учетом порогового уровня маркера, соответствующего 95 % доверительному интервалу, рассчи-

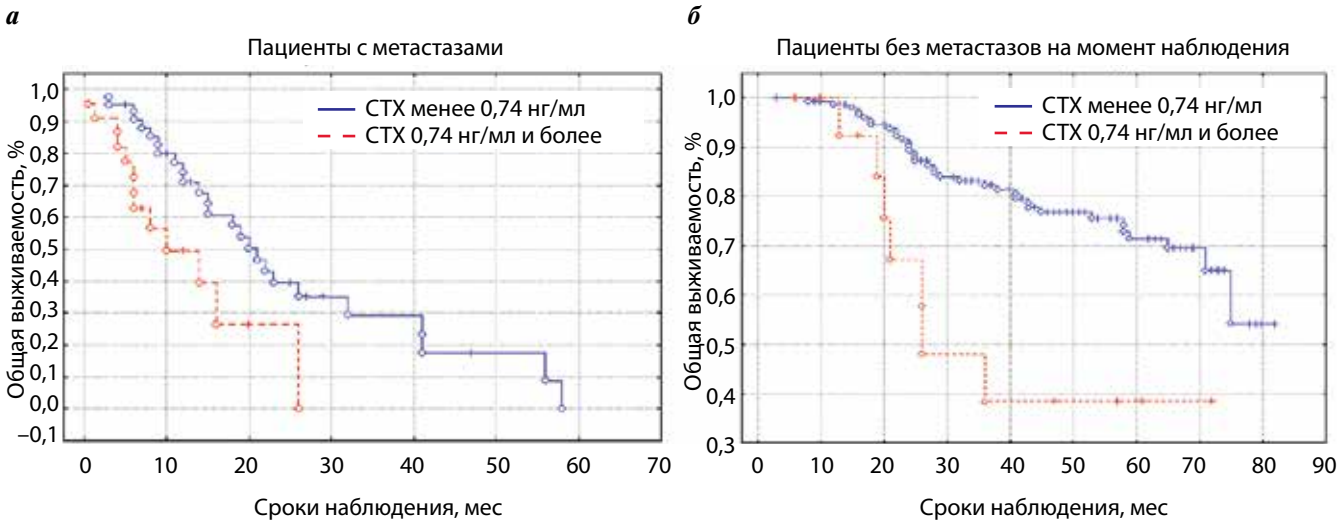

Рис. 1. *Общая выживаемость больных РМЖ с метастазами в костях (а) и без исходных метастазов (б) в зависимости от уровня СТХ*

танному по результатам определения показателей в контрольной группе. Анализ общей выживаемости проведен в 3 группах больных: 1) группа больных с исходными метастазами в костях и постоянным противоопухолевым лечением; 2) группа больных без поражения скелета; 3) группа больных с развившимися в процессе 6-летнего наблюдения метастазами, не получавших до обследования противоопухолевой терапии. В соответствии с кривыми выживаемости, при значениях СТХ выше порогового уровня (0,74 нг/мл) в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях 3-летняя общая выживаемость была нулевой, тогда как в подгруппе пациенток с низкими показателями она составила 30 % (рис. 1*а*; $p < 0,05$). При этом медиана общей выживаемости при повышенных уровнях СТХ, отражающих усиленный остеолиз, была достоверно ниже по сравнению с группой больных с нормальным уровнем маркера (11,9 и 21,7 мес соответственно; $p < 0,03$).

Анализ 5-летней общей выживаемости больных РМЖ без признаков поражения скелета выявил ее зависимость от уровня СТХ как при первичном определении, так и в процессе динамического наблюдения. При значениях СТХ выше порогового уровня 5-летняя выживаемость составила 28,5 %, тогда как при показателях < 0,74 нг/мл она была достоверно выше (71,5 %; $p = 0,015$) (рис. 1*б*).

Проанализирована выживаемость в подгруппе больных РМЖ с развившимися в период наблюдения костными метастазами, у которых в большинстве случаев уровни маркеров были повышены. При этом оценка общей выживаемости в этой группе больных проведена с учетом результатов определения СТХ в ближайшие сроки до выявления метастазов. Пятилетняя общая выживаемость пациенток с высокими уровнями СТХ была нулевой, тогда как при нормальных значениях показателя она составила 55,5 % (рис. 2; $p < 0,05$). При этом медиана выживаемости пациенток с повышенными уровнями СТХ, отражающими усиленный остеолиз, была достоверно ниже, чем у больных с нормальным уровнем маркера (20,5 и 40,1 мес соответственно; $p < 0,05$).

Многофакторный анализ, включавший основные клинико-морфологические характеристики РМЖ и уровни биохимических показателей костного метаболизма, доказал, что СТХ является независимым фактором прогноза развития костных метастазов наряду с таким фактором, как степень злокачественности опухоли.

Клиническое значение биохимических маркеров остеосинтеза

Показатели ЩФ коррелируют с активностью остеобластов, что способствовало внедрению общей активности ЩФ и ее костной фракции в клиническую практику в целях диагностики и мониторинга заболеваний скелета (см. табл. 1). Однако до настоящего вре-

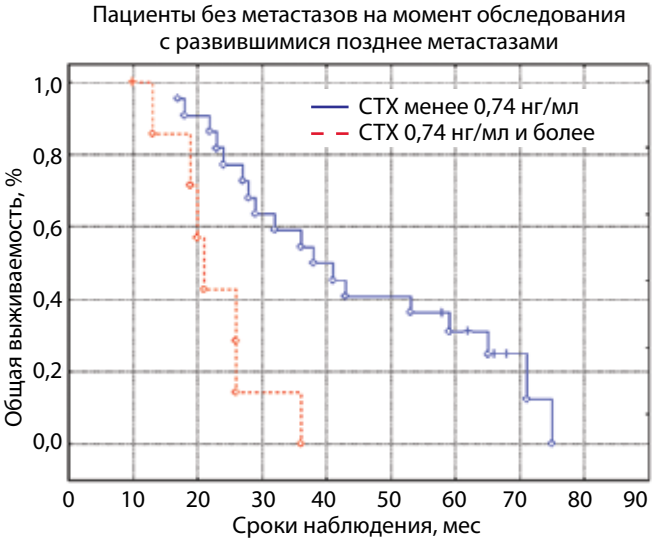

Рис. 2. *Общая выживаемость больных РМЖ с развившимися в период наблюдения метастазами в зависимости от уровней СТХ*

мени исследователи не пришли к единому мнению по поводу значения других биохимических показателей, участвующих в процессах формирования костной ткани, в качестве маркеров костных метастазов. В единичных работах продемонстрирована прямая корреляция результатов определения общей активности ЩФ, КЩФ, остеокальцина и СТХ [53, 61], хотя КЩФ проявляла большую диагностическую чувствительность. В соответствии с данными различных авторов, увеличение концентрации остеокальцина и PICP в сыворотке крови онкологических больных с метастазами в костях по сравнению с активностью КЩФ, как правило, выражено в значительно меньшей степени.

Оказалось, что активность КЩФ повышается у больных раком простаты с метастазами в костях, ее увеличение было максимальным по степени (1,5–5 раз) и частоте (68–80 %) [61, 62]. При РМЖ степень увеличения активности фермента была несколько ниже (1,2–2,5 раза), а частота соответствовала 53–68 % [47, 61, 63]. Следует отметить, что при сравнительном анализе результатов определения общей и специфической активности фермента у онкологических больных с костными метастазами и без таковых большинство авторов отмечают значительно более высокие уровни ЩФ при метастатическом поражении скелета [50, 61, 63], а также указывают на отсутствие достоверных различий между группой больных без признаков поражения скелета и контролем [61, 64]. Однако, по данным некоторых авторов, активность ЩФ и КЩФ у онкологических больных без костной деструкции достоверно повышена по отношению к соответствующим нормальным значениям маркера [52, 63].

Согласно нашим данным, полученным при определении общей активности ЩФ в сыворотке крови 271 онкологического больного с поражением скелета, наибольшая гиперферментемия отмечена у больных раком простаты (1092 ± 191 Ед/л), и она достоверно превышала соответствующие показатели при РМЖ (407 ± 28 Ед/л) и раке легкого (517 ± 124 Ед/л) [48]. Во всех группах больных с поражением скелета, за исключением больных множественной миеломой, у которых средний уровень фермента оставался в норме, активность ЩФ достоверно превышала показатель контрольной группы (250 Ед/л). С наибольшей частотой гиперферментемию выявляли при раке простаты (80,5 %), при этом более чем у 50 % больных обнаружено резкое (от 2 до 21,5 раза) увеличение ЩФ. При РМЖ и раке легкого гиперферментемию выявили в 58 и 76 % наблюдений, в основном она носила умеренный характер. Для КЩФ закономерности были аналогичные, что позволяет нам рассматривать данный фермент как самостоятельный диагностический критерий костных метастазов при раке простаты.

Активность КЩФ у больных РМЖ с множественными метастазами в костях достоверно превышала таковую у пациентов с единичными метастазами, при патологическом переломе и выраженном болевом синдроме (табл. 4).

Таблица 4. *Активность КЩФ у больных РМЖ в зависимости от клинических характеристик метастатического процесса*

Критерий	КЩФ (Ед/л)	*p*
Распространенность поражения скелета		
Множественные метастазы	33,1 (5,4–80,5)	0,02
Единичные метастазы	0,64 (0,54–0,75)	
Патологический перелом		
Наличие	54,5 (9,5–160,6)	0,005
Отсутствие	29,8 (11,8–93,2)	
Болевой синдром		
Сильный	59,8 (11,8–185,3)	0,01
Умеренный	34,6 (9,5–160,6)	

У больных РМЖ с костными метастазами выявлены достоверные различия в зависимости от уровня КЩФ по показателю 3-летней общей выживаемости, который был нулевым при гиперферментемии (> 43,7 Ед/л), тогда как при благоприятных (ниже порогового уровня) значениях фермента она составила 39,1 % (рис. 3*а*). В группе без исходных метастазов также установлены достоверные различия ($p = 0,015$) с учетом порогового уровня КЩФ (43,7 Ед/л): 5-летняя выживаемость была существенно ниже (23,8 %) при гиперферментемии, тогда как при нормальных значениях маркера она достигала 72,2 % (рис. 3*б*).

Кроме того, выявлены достоверные различия медианы общей выживаемости пациенток обеих групп. При этом медиана общей выживаемости пациенток с исходными метастазами при показателях КЩФ в пределах нормы составила 24,2 мес, достоверно ($p = 0,011$) превышая таковую при гиперферментемии (13,4 мес). Медиана выживаемости у пациенток без метастатического поражения скелета в подгруппе с нормальными показателями не была достигнута, тогда как при повышенных значениях КЩФ по отношению к пороговому уровню соответствовала 27 мес.

Заключение

Таким образом, оценка состояния костного ремоделирования на основе исследования СТХ и КЩФ в сыворотке крови больных РМЖ имеет прогностическое значение не только в отношении дальнейшего клинического течения болезни, но и в отношении прогноза жизни. Проведенный многофакторный анализ установил прогностическую значимость СТХ и КЩФ наряду с важными клинико-морфологическими характеристиками РМЖ. Полученные результаты с учетом наибольшей значимости СТХ послужили основанием для включения показателя остеолиза в ал-

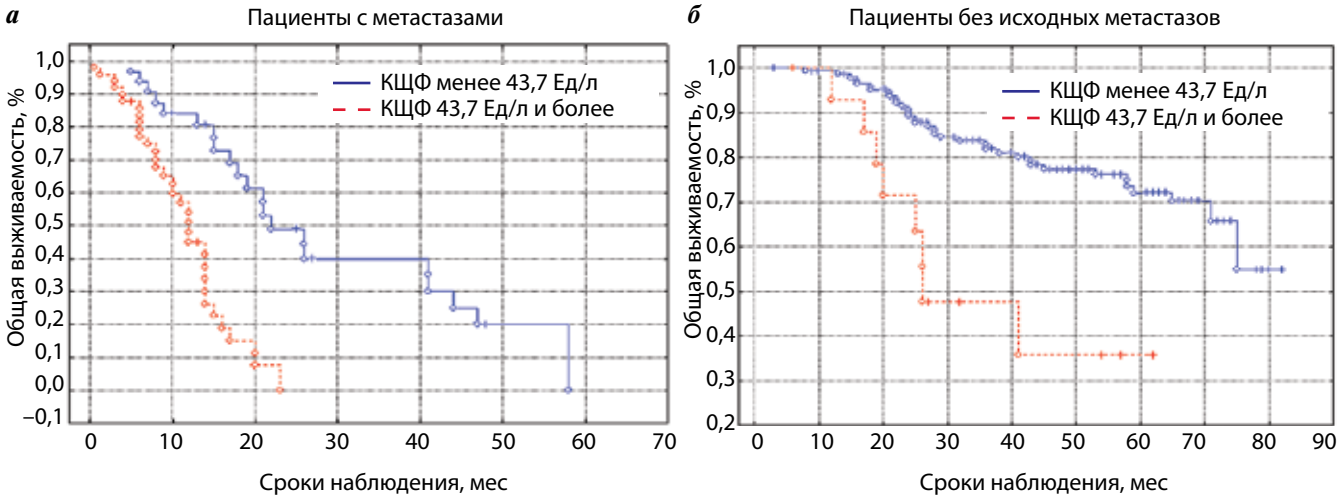

Рис. 3. *Общая выживаемость больных РМЖ с метастазами в костях (а) и без исходных метастазов (б) в зависимости от уровней КЩФ*

горитм обследования больных РМЖ с целью повышения точности диагностики ранних костных метастазов, оценки прогноза и оптимизации тактики применения бисфосфонатов.

Интерес к биохимическим маркерам костного ремоделирования как неинвазивным методам обследования онкологических больных усиливается по мере внедрения в клиническую практику современных лабораторных технологий. Работы последних лет свидетельствуют о возможности их применения не только в целях мониторинга и прогноза, но и для проведения ранней диагностики метастазов в костях [65]. Выполненный K. Jung и M. Lein метаанализ результатов определения маркеров костного метаболизма у пациентов с различными локализациями опухолей (рак легкого, почки, простаты, РМЖ) свидетельствует о необходимости разработки количественных критериев для каждого из маркеров (NTX, CTX, ICTP, DKK, PYD, DPD, КЩФ) с учетом их специфичности, а также особенностей костной деструкции [66]. Стандартизация исследования биохимических маркеров костного ремоделирования необходима для оптимизации обследования онкологических больных с опухолями повышенной остеотропности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под ред. М. И. Давыдова, Е. М. Аксель. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Statistics of malignant tumours in Russia and CIS countries in 2012. under the editorship of M. I. Davydova, E. M. Aksel. Moscow: Publishing Group of Russian Cancer Research Center, 2014. Pp. 226. (In Russ.)].
2. Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е. Маркеры костного ремоделирования: общие представления и клиническое значение при поражении скелета у онкологических больных. Вопросы онкологии 2001;47(1):18–23. [Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E. Bone turnover markers: fundamental understanding and clinical relevance at skeletal lesion in oncologic patients. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2001;47(1):18–23. (In Russ.)].
3. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С. Роль системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе первичных и метастатических опухолей костей. Патогенез 2013;11(4):9–15. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S. Role of RANK/RANKL/OPG system in pathogenesis of primary and metastatic bone tumours. Patogenez = Pathogenesis 2013;11(4):9–15. (In Russ.)].
4. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С., Герштейн Е. С., Соловьев Ю. Н. Клинические перспективы исследования компонентов системы RANK/RANKL/OPG при первичных и метастатических опухолях костей. Вопросы онкологии 2014;60(4):413–21. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S., Gershteyn E. S., Solovyev Y. N. Clinical prospects of system RANK/RANKL/OPG components research at primary and metastatic bone tumours. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2014;60(4):413–21. (In Russ.)].
5. Lee J. A., Jung J. S., Kim D. H. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. Pediatr Blood Cancer 2011;56(5):738–43.
6. Roodman D. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 2004;350(16):1655–64.
7. Chu G. C., Chung L. W. RANK-mediated signaling network and cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 2014;33(2–3): 497–509.
8. Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. Nature 2010;468(7320):98–102.
9. Martin T. J. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. World J Orthop 2013;4(4):186–97.
10. Morony S., Capparelli C., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. Cancer Res 2001;61(11):4432–6.
11. Choi H. K., Kang H. R., Jung E. et al. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis. Cell Res 2013;23(4): 524–36.
12. Rucci N., Millimaggi D., Mari M. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancerinduced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. Cancer Res 2010;70(15):6150–60.
13. Coleman R. E., Major P., Lipton A. et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with

bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. J Clin Oncol 2005;23(22):4925–35.
14. Body J. J., Greipp P., Coleman R. E. et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. Cancer 2003;97(3 Suppl):887–92.
15. ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): NIH. Single ascending-dose study to characterize the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of CEP-37251 in healthy postmenopausal women. 2010. Available from: http://clinicaltrials.gov/show/NCT01159873.
16. Riggs B. L., Khosla S., Atkinson E. J. et al. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. Osteoporos Int 2003;14(9):728–33.
17. Fizazi K., Lipton A., Mariette X. et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. J Clin Oncol 2009;27(10):1564–71.
18. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С., Соловьев Ю. Н. и др. Компоненты системы RANK/RANKL/OPG, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-16, ММП-2 и кальцитонин в сыворотке крови больных с новообразованиями костей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014;157(4):522–6. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S., Solovyev Y. N. et al. Components of system RANK/RANKL/OPG, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2 and calcitonin in blood serum of bone tumors patients. Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2014;157(4):522–6. (In Russ.)].
19. Wozney J. M. Overview of bone morphogenetic proteins. Spine (Phila Pa 1976). 2002;27(16 Suppl 1):2–8.
20. Hofbauer L. C., Rachner T., Singh S. K. Fatal attraction: why breast cancer cells home to bone. Breast Cancer Res 2008;10(1):101.
21. Roodman D. Biology of osteoclast activation in cancer. J Clin Oncol 2001;19(15):3562–71.
22. Sezer O., Heider U., Zavrski I. et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. Blood 2003;101(6):2094–8.
23. Pearse R. N., Sordillo E. M., Yaccoby S. et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to stimulate bone destruction and promote tumor progression. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(20):11581–6.
24. Choi S. J., Cruz J. C., Craig F. et al. Macrophage inflammatory protein 1–alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. Blood 2000;96(2):671–5.
25. Min H., Morony S., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J Exp Med 2000;192(4):463–74.
26. Choi S. J., Oba Y., Gazitt Y. et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1–alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. J Clin Invest 2001;108(12):1833–41.
27. Tian E., Zhan F., Walker R. et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. N Engl J Med 2003;349(26): 2483–94.
28. Fujita K., Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. Mol Cancer 2007;6:71.
29. Hameed A., Brady J. J., Dowling P. et al. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. Cancer Growth Metastasis 2014;7:33–42.
30. Li X., Liu Y., Wu B. et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. Oncol Rep 2014;32(6):2605–11.
31. Yamabuki T., Takano A., Hayama S. et al. Dikkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. Cancer Res 2007;67(6):2517–25.
32. Mundy G. R., Boyce B. F., Yoneda T. Mechanisms of osteolytic bone destruction. In: Metastatic Bone Disease: Fundamental and Clinical Aspects. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1994. Pp. 86–92.
33. Ratcliffe W. A., Bowden S. J. Parathyroid hormone-related protein: Assay and their clinical applications. In.: Calcium Regulating Hormones and Markers of Bone Metabolism: Measurement and Interpretation. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 71–8.
Моисеенко В. М., Семиглазов В. Ф., Тюляндин С. А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. СПб.: Грифон, 1997. 248 с. [Moiseenko V. M., Semiglazov V. F., Tyulyandin S. A. Modern medical therapy of locally advanced and metastatic breast cancer. St. Petersburg: Grifon, 1997. 248 p. (In Russ.)].
34. Moss D. W. Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. Clin Biochem 1987;20(4):225–30.
35. Kress B. C. Bone alkaline phosphatase in normal and disease processes. In: Calcium regulating hormones and markers of bone metabolism: measurement and interpretation. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 171–82.
36. Van Straalen J. P., Sanders E., Prummel M. F., Sanders G. T. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. Clin Chim Acta 1991;201(1–2):27–33.
37. Price C. P., Thompson P. W. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. Ann Clin Biochem 1995;32(Pt 3):244–60.
38. Robins S. P., Stewart P., Astbury C., Bird H. A. Measurement of the crosslinking compound, pyridinoline, in urine as an index of collagen degradation in jont diseases. Ann Rheum Dis 1986;45(12):969–73.
39. Robins S. P., Black D., Paterson C. R. et al. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. Eur J Clin Invest 1991;21(1):310–5.
40. Robins S. P. Measurement of pyridinium crosslinks by HPLC and immunoassay. In: Calcium regulating hormones and markers of bone metabolism: measurement and interpretation. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 135–40.
41. Becker S., Traber L., Schmidt-Gayk H. Free and peptide-bound pyridinium crosslinks in urine measured in healthy people, women after menopause and patients with bone metastases. In: Calcium regulating hormones and markers of bone metabolism: measurement and interpretation. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 141–6.
42. Delmas P. D. Biochemical markers of bone turnover. Acta Orthop Scand Suppl 1995;266:176–82.
43. Bonde M., Qvist P., Fledelius C. et al. Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): Follow-up on hormone re-placement therapy and osteoporosis risk assessment. J Clin Endocrinol Metab 1995;80(3):864–8.
44. Hanson D. A., Weis M. A., Bollen A. M. et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. J Bone Miner Res 1992;7(11):1251–8.
45. Рожинская Л. Я. Остеопороз: диагностика нарушений метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена. Клиническая и лабораторная диагностика 1998;(5):25–32. [Rozhinskaya L. Y. Osteoporosis: diagnostics of bone tissue metabolism and calcium-phosphoric metabolism disturbances. Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika = Clinical and Laboratory Diagnostics 1998;(5):25–32. (In Russ.)].
46. Body J. J., Dumon J. C., Gineyts E., Delmas P. D. Comparative evaluation of markers of bone resorption in patients with breast cancer-induced osteolysis be-fore and after biphosphonate therapy. Br J Cancer 1997;75(3):408–12.
47. Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е., Робинс С. П. Маркеры резорбции костной ткани при метастатическом поражении скелета. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1998;(3):323–8. [Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E., Robins S. P. Bone resorption markers at metastatic bone disease. Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1998;(3):323–8. (In Russ.)].
48. Любимова Н. В., Никитина О. Ю., Робинс С. П., Кушлинский Н. Е. Биохимические маркеры костного

ремоделирования у онкологических больных с поражением скелета. Вопросы онкологии 2000;(5):13–8. [Lyubimova N. V., Nikitina O. Y., Robins S. P., Kushlinsky N. E. Bone turnover biochemical markers in oncologic patients with skeletal lesion. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2000; (5):13–8. (In Russ.)].
49. Withold W., Friedrich W., Reinauer H. Comparision of biochemical markers of bone resorption in patients with metabolic and malignant bone diseases. Ann Clin Biochem 1996;33(Pt 5):421–7.
50. Lipton A., Demers L., Daniloff Y. et al. Increased urinary excretion of pyridinium cross-links in cancer patients. Clin Chem 1993;39(4):614–8.
51. Pecherstorfer M., Zimmer-Roth I., Schilling T. et al. The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, serum total phosphatase, and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease. J Clin Endocrinol Metab 1995;80(1): 97–103.
52. Seibel M. J., Lambrinoudaki I., Zipf A. Biochemical markers of bone metabolism in metastatic bone disease. In: Metastatic bone disease: fundamental and clinical aspects. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1994. Pp. 109–26.
53. Lumachi F., Santeufemia D. A., Del Conte A. et al. Carboxy-terminal telopeptide (CTX) and amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen as markers of bone metastases in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2013;33(6):2593–6.
54. Addison C. L., Pond G. R., Zhao H. et al. Effects of de-escalated bisphosphonate therapy on bone turnover biomarkers in breast cancer patients with bone metastases. Springerplus 2014;3:577.
55. Любимова Н. В., Кожарская Г. В., Агеева Т. В. и др. Клиническое значение биохимических показателей костного ремоделирования при поражении скелета у больных раком молочной железы. Молекулярная медицина 2012;(5):25–9. [Lyubimova N. V., Kozharskaya G. V., Ageeva T. V. et al. Clinical relevance of bone turnover biochemical indices at skeletal lesion in breast cancer patients. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medecine 2012;(5):25–9. (In Russ.)].
56. Kylmälä T., Tammela T. L., Risteli L. et al. Type I collagen degradation product (ICTP) gives information about the nature of bone metastases and has prognostic value in prostate cancer. Br J Cancer 1995;71(5):1061–4.
57. Brown J. E., Cook R. J., Major P. et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer and other solid tumors. J Natl Cancer Inst 2005;97(1):59–69.
58. Ali S. M., Demers L. M., Leitzel K. et al. Baseline serum NTx levels are prognostic in metastatic breast cancer patients with bone-only metastasis. Ann Oncol 2004;15(3):455–9.
59. Семенов Н. Н., Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е., Личиницер М. Р. С-концевой телопептид коллагена I типа в моче – фактор прогноза при метастатическом поражении скелета у больных раком молочной железы. Технологии живых систем 2012;9(3):3–7. [Semenov N. N., Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E., Lichinitser M. R. Beta-cross laps in urine as forecast factor at metastatic skeletal lesion in breast cancer patients. Tekhnologii zhivykh system = Living Systems Technologies 2012;9(3):3–7. (In Russ.)].
60. Berruti A., Piovesan A., Torta M. et al. Biochemical evaluation of bone turnover in cancer patients with bone metastases. Br J Cancer 1996;73(12):1581–7.
61. Du W. X., Duan S. F., Chen J. J. et al. Serum bone-specific alkaline phosphatase as a biomarker for osseous metastases in patients with malignant carcinomas: a systematic review and meta-analysis. J Cancer Res Ther 2014;10(Suppl 2):140–3.
62. Demers L. M., Costa L., Chinchilli V. M. et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. Clin Chem 1995;41(10):1489–94.
63. Li F., Pitt P. I., Sherwood R. et al. Biochemical markers of bone turnover in women with surgically treated carcinoma of the breast. Eur J Clin Invest 1993;23(9):566–71.
64. Tang C., Liu Y., Qin H. et al. Clinical significance of serum BAP, TRACP 5b and ICTP as bone metabolic markers for bone metastasis screening in lung cancer patients. Clin Chim Acta 2013;426:102–7.
65. Jung K., Lein M. Bone turnover markers in serum and urine as diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers of bone metastasis. Biochim Biophys Acta 2014;1846(2):425–38.