

Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju
Referentni centar MZSS RH za reumatoidni artritis
Klinički bolnički centar Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

BIOKEMIJSKI MARKERI U OSTEOARTRITISU

BIOMARKERS IN OSTEOARTHRITIS

Đurđica Babić-Naglić ♦ Božidar Ćurković

Sažetak

Osteoarthritis (OA) je bolest koja zahvaća sve zglobne strukture. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke i radiološke slike, a specifičnog laboratorijskog nalaza nema. Biomarkeri za OA su fragmenti proteina kosti, hrskavice i sinovijske membrane koji se mogu analizirati u krvi, urinu i zglobnoj tekućini. Identificiran je čitav niz proteina zglobnog metabolizma, ali je njihovo tumačenje još nejasno jer je teško odrediti kojoj strukturi zgloba i kojem zglobu pripadaju. Vrijeme uzimanja biološkog uzorka tijekom 24 sata,

neposredna aktivnost i konzumiranje hrane prije uzimanja uzorka, metode analize i referentne vrijednosti pojedinih biomarkera su otvorena pitanja koja zahtijevaju standardizaciju postupaka i validaciju rezultata. Unatoč brojnih istraživanja još nema konačnih preporuka za njihovu primjenu u rutinskom radu. Od svih biokemijskih markera jedino su kolageni telopeptid u urinu (uCTX-II), hijaluronan (HA) i hrskavični oligomerni protein matriksa (COMP) potencijalni pokazatelji aktivnosti degenerativne bolesti zgloba.

Ključne riječi

osteoarthritis, biokemijski markeri

Summary

Osteoarthritis (OA) is a progressive disorder that affects articular cartilage, subchondral bone and synovial membrane. Clinical and radiological findings are the mainstay of the diagnosis because a specific laboratory findings are lacking. Biomarkers are the fragments of proteins of the bone, cartilage and synovial membrane that can be detected in blood, urine and synovial fluid. Many protein products of the joint metabolism have been recognized but its role in disease process remains unclear. To optimize results it is important

to determine time of a day, food consumption and patient activity due to sampling, to standardize analytic procedures and referral values and to validate results. Diverse results of many investigations hamper the final agreement regarding the usage of particular biomarker in OA. It seems that urinary carboxyl-terminal cross-linked telopeptide of type II collagen (uCTX-II), hyaluronic acid (HA) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) are the most promising biochemical indices in OA regarding disease activity.

Keywords

osteoarthritis, biomarkers

Skraćenice korištene u radu

ADAMTS - disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs; **C2C** - neoepitop kolagena tip II razgrađen kolagenazom; **COMP** - hrskavični oligomerni protein matriksa; **CTX** - C terminalni kolageni telopeptid; **D-Pyr** - deoksipiridinolin; **HA** - hijaluronan; **HELIX II** - spiralna komponenta kolagena tip II; **KS-5D4** - keratan sulfat; **MMP** - matriks metaloproteinaze; **NTX** - N telopeptid; **PINP** - ami-

no-terminalni prokolageni propeptid tip I; **PICP** - karboksi-terminalni prokolageni propeptid tip I; **PIICP** - karboksi-terminalni prokolageni propeptid tip II; **PIIANP** - amino-terminalni prokolageni propeptid tip IIA; **PIIINP** - amino-terminalni prokolageni propeptid tip III; **Pyr** - piridinolin; **TIMP** - tkivni inhibitor metaloproteinaze; **TGF-β1** - faktor rasta β1; **YKL-40** - humani hrskavični glikoprotein 39.

prof.dr.sc. Đurđica Babić-Naglić

Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju ♦ Referentni centar MZSS RH za reumatoidni artritis
Klinički bolnički centar Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

Osteoarthritis (OA) je najčešća zglobna bolest karakterizirana propadanjem hrskavice, promjenama subhondralne kosti, tetiva i ligamenata te sinovitisom. Zahaćenost svih zglobnih struktura u biološkom smislu predstavlja "popuštanje" organa za kretanje analogno popuštanju srca ili insuficijenciji bubrega. Bol i nesposobnost su glavna klinička obilježja OA. Liječenje je simptomatsko i funkcionalno jer još nema lijekova koji mijenjaju tijek bolesti. Rizici za OA su nasljeđe, dob, debljina, biomehanički poremećaj zgloba i spol. Bazična istraživanja iz područja OA usmjerena su prema otkrivanju gena odgovornih za razvoj OA, primjeni regenerativnih metoda od autologne transplantacije hondrocita do implantacije matičnih stanica, a najveći broj posvećen je otkrivanju biokemijskih markera kojima bi se odredila laboratorijska slika bolesti.

Dijagnoza OA postavlja se na temelju kliničkih simptoma i/ili strukturnih promjena verificiranih nekom slikovnom tehnikom. Radiološka dijagnoza još uvijek je "zlatni standard" i gotovo nikada se dijagnoza OA ne postavlja bez klasičnih radiograma. Kod OA hematološka, imunološka i biokemijska analiza imaju isključnu ulogu i ne predstavljaju potvrdu dijagnoze ili težine OA. Zadnjih nekoliko desetljeća pokušavaju se definirati fragmenti zglobnih struktura ili biokemijski biljezi relevantni za OA odnosno molekule čije koncentracije u tjelesnim tekućinama (krv, urin, zglobna tekućina) reflektiraju zbivanja u zglobu i koji bi mogli zamijeniti slikovne tehnike u praćenju bolesnika. Dva su osnovna problema. Prvi je složena građa zgloba, a drugi varijabilan prirodni tijek i nerijetko višestruka lokalizacija OA. Degenerativni proces u zglobu karakteriziran je fazama evolucije i remisije što ima utjecaja na nalaze pojedinih biomarkera. Zglob je građen od više vrsta tkiva (kost, hrskavica, sinovijska opna i drugo) koja sadrže neke jednake komponente pa je teško odrediti kojoj strukturi ili kojem zglobu one pripadaju, kosti ili hrskavici promatranog zgloba, koštanoj pregradnji cijelog skeleta ili nekog drugog zgloba?

Metabolizam zdrave hrskavice ima balansirane faze izgradnje i razgradnje. Kod OA izmjenjuje se aktivna faza bolesti (razgradnja) s reparacijskom fazom (sanacija, izgradnja) u kojima se ispoljava isti biomarker i stoga može imati dvojako značenje. Osim toga biomarkeri su sistemski parametri (krv, urin) i ne moraju se uvijek odnositi na klinički aficiran zglob jer istodobno mogu predstavljati početak OA na nekoj drugoj lokalizaciji. Razina biomarkera ovisna je i o nekim ekstrartikularnim faktorima kao što su doba dana (cirkadijalni ritam ili dnevne varijacije razine biomarkera), vrijeme obroka (hijaluronan [HA] se stvara u sinoviocitima i u drugim stanicama, cirkulirajuće vrijednosti najveće su neposredno nakon obroka), fizičkoj aktivnosti (povećanje HA i matriks metaloproteinaze-3 [MMP-3] nakon opterećenja), bolestima jetre i bubrega (klirens biomarkera), životnoj dobi i

spolu te kirurškim zahvatima. To su neki od razloga zbog kojih još uvijek nema jedinstvenog i validiranog biomarkera koji bi omogućio "preradiološku" dijagnozu, odredio aktivnost i prognozu OA. Tehnološke mogućnosti dozvoljavaju identifikaciju praktično svakog produkta metabolizma zgloba, ali nedostaje pouzdano kliničko tumačenje dobivenog rezultata. I dalje je otvoreno pitanje da li imaju dijagnostičku vrijednost u bolestima kao što su OA ili osteoporoza. Od analize biomarkera se očekuje bolje razumijevanje patofiziologije OA i temeljem toga stvaranje lijekova koji modificiraju tijek bolesti (DMARDs od engl. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs). Dok se ne pojave DMARDs-i za OA biokemijski biljezi nemaju svrhu u rutinskom kliničkom radu.

Kost, hrskavica i sinovija su potencijalni izvori biokemijskih biljega za OA.

Matriks kosti je građen od molekula kolagena tipa I koje su povezane molekulama piridinolina (Pyr) i deoksipiridinolina (D-Pyr). Od nekolagenih molekula za matriks kosti specifični su osteokalcin i koštani sijaloprotein (BSP) (1).

Sinoviociti (B stanice sinovijske membrane) su stanice slične fibroblastima i stvaraju intersticijski matriks koji sadrži kolagene tipa I, III, IV, V i VI. Kolagen tipa VI je nazastupljeniji u sinovijskoj membrani, veže se za HA, otporan je na MMP i čuva strukturni integritet zgloba. Sinovijska tekućina je pasivni filtrat plazme s malim razlikama u količini i sadržaju. Za razliku od plazme sadrži HA i lubricin koji su produkti pokrovnih sinovijskih stanica. Lubrikaciju zgloba održava HA. Hijaluronan je glukozaminoglikan velike molekularne težine, dugi polisaharidni lanac molekularne težine $\sim 0,5 \times 10^6$ daltona koji se u zglobu nalazi u koncentraciji 0,1-5 mg/l. U oboljelom zglobu HA je depolimeriziran s gubitkom fizioloških reoloških svojstava. Subsinovijsko tkivo građeno je od mreže limfnih žila važnih za drenažu zgloba, odstranjivanje viška tekućine i razgradnih intraartikularnih makromolekula (klirens). Ekstracelularni matriks subsinovije sadrži kolagen tipa I i III i glukozaminoglikane. Sve spomenute molekule i njihovi fragmenti su potencijalni biomarkeri metabolizma sinovijske membrane. Nedostatak im je što većina nije specifična za sinovijsko tkivo i istraživanja su usmjerena prema identifikaciji posttranslacijskih varijanti ovih molekula koje su specifične za sinoviju (1).

Zglobna hrskavica je dvokomponentno tkivo. Tekući dio sadrži vodu i elektrolite, a čvrsti dio kolagen, proteoglikane, glukoproteine, druge proteine i hondrocite (tablica 1). Proteolitički enzimi razgrađuju matriks hrskavice. Među njima najvažnija je skupina agrekanaza koje djeluju na proteoglikane i kolagenaza koje razgrađuju kolagen.

Hondrociti sintetiziraju kolagen tipa II i agrekan koji su najzastupljeniji i specifični za zglobni matriks. Kolagen tipa II formira temeljnu fibrilarnu strukturu ek-

Tablica 1. **Grada zglobne hrskavice**
(modificirano prema 1)
Table 1. **Composition of articular cartilage**
(modified according to 1)

Komponenta	% sadržaja
Voda	50-85
Kolagen tip II	15-22
Agrekan	4-7
COMP (cartilage oligomeric matrix protein)	0,5-1
Vezni proteini (cross links)	-
Hijaluronan (HA)	-
Drugi kolageni (tip I, V, VI, IX, XI)	-
Ostalo	-

stracelularnog matriksa, a s kolagenima tipa IX i XI stvara hibridne molekule. Po strukturi je homotrimer čije su molekule spiralno vezane u oblik pletenice. U hrskavici su kovalentno vezane Pyr dok su u kosti vezane D-Pyr. Kolagen tipa IX čini oko 1% ukupnog kolagena hrskavice i veže se na neke fibrile kolagena tipa II, a odgovoran je za trodimenzionalnu strukturu kolagene mreže. Oštećenje funkcije kolagena tipa IX potpomaže degeneraciju hrskavice. U hondrocitima kolagen tipa II prolazi kroz specifične posttranslacijske modifikacije sinteze po čemu se razlikuje od drugih kolagena kao npr. onih u kosti (tip I). Nakon sekrecije iz hondrocita enzimi odvajaju slobodne krajeve molekule od spiralne srži. Ovi otcijepljeni dijelovi molekule kolagena tipa II su prokolageni propeptidi (PIINP, PIICP) i predstavljaju biokemijske markere sinteze hrskavice. Hondrociti i sinoviociti izlučuju proteolitičke enzime koji razgrađuju kolagen (metaloproteinaze, gelatinaze, stromelizin). Kod OA povećana je ekspresija

ja MMP-13 za koju se smatra da je najrazorniji degradacijski enzim (2). Hondrociti imaju funkciju mehanosenzora u zglobu i mehanički stres stvara celularni signal za sintezu proupalnih citokina i degradacijskih enzima (3). Zbog toga su debljina i biomehanički poremećaji značajni rizični faktori za razvoj i perpetuaciju OA (4). Agrekan je važna sastavnica matriksa, a to je proteoglikan građen od niti sržnog proteina na koji su kovalentno vezani lanci glukozaminoglikana (keratan-sulfat i kondroitin-sulfat). Ukupna molekularna težina može biti do ~2200 kd. Smanjenje količine agrekana u hrskavici znači gubitak biomehaničkog integriteta zgloba i početak ireverzibilnih destruktivnih procesa. Agrekanaze su ekstracelularne proteaze poznate kao ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs). Među njima su ADAMTS-4 i ADMATS-5 prepoznati kao još jedna linija destruktivnih enzima u OA (2). Fragmenti kolagena tipa II i agrekana su potencijalni indikatori kataboličke faze metabolizma hrskavice. U tablici 2 prikazani su najčešće određivani biomarkeri za OA.

Objavljeno je niz radova s različitim metodama istraživanja, odabira bolesničkih skupina i lokalizacija OA te velikog broja promatranih molekula što rezultira različitim podacima i zaključcima koji se još ne mogu sistematizirati i prenijeti u kliničku praksu. Kolagen tipa II je najvažniji protein matriksa hrskavice jer održava njen morfološki i funkcionalni integritet. Poremećaj metabolizma kolagena tipa II izaziva progresivni gubitak hrskavice. Degradacijski marker C terminalni kolageni telopeptid iz urina (uCTX-II) i hondrocitni marker amino-terminalni prokolageni propeptid tip IIA iz seruma (sPIIANP) su pokazatelji progresije OA s relativnim rizikom 2,02/1,75

Tablica 2. **Biokemijski markeri metabolizma kosti, hrskavice i sinovijske membrane** (modificirano prema 1,5)
Table 2. **Biomarkers of bone, cartilage and synovial turnover** (modified according to 1,5)

Mjesto	Vrsta	Sinteza	Degradacija
Kost	Kolagen tip I	N/C prokolageni propeptidi (PINP/PICP)	Deoksimiridinolin i piridinolin (S/U) N/C telopeptidi (S/U)
	Nekolageni proteini	Koštana alkalna fosfataza Osteokalcin	Izoenzim 5b kisele fosfataze Koštani sijaloprotein (S)
Hrskavica	Agrekan	Kondroitin sulfat (epitopi)	Fragmenti "core" proteina Keratan sulfat (epitopi)
	Kolagen tip II	Prokolageni propeptidi (PIICP/PIIANP)	Piridinolin (U) α lanci kolagena tip II (U) Telopeptid (U) HELIX-II
Sinovija	Neagrekanski i nekolageni proteini	YKL-40	COMP
	Kolagen tip I i tip III	Prokolageni propeptidi tip I i III (PIIINP) (S/ST)	Piridinolin (S/U/ST) N/C telopeptidi (S/U)
	Nekolageni proteini	Hijaluronan (S) YKL-40 (S/ST) COMP (S/ST) MMP-1, MMP-3, TIMP (S/ST)	

U - urin S - serum ST - sinovijska tekućina

što znači da se mjerenjem produkata metabolizma kolagena tipa II može odrediti prognoza OA (6).

Analiza molekularnih biomarkera kod OA kuka (N=376) u odnosu na aktivnost bolesti i radiološku sliku pokazuje da je intenzitet boli povezan sa razinom uCTX-II i hsCRP (high sensitivity CRP), sinovitis s razinom COMP, a radiološka slika s uCTX-II (7). Piridinolin i tkivni inhibitor metaloproteinaza-1 (TIMP-1) koreliraju s radiološkim stupnjem OA po Kellgren-Lawrenceu dok su CRP, Pyr, humani hrskavični glukoprotein 39 (YKL-40) i MMP-3 značajno viši kod generaliziranog oblika OA (8). U prospektivnom praćenju bolesnika utvrđeno je da jednokratno mjerena povišena razina CTX-II i HA predstavljaju rizik za progresivni oblik OA (9).

Hrskavični oligomerni protein matriksa (COMP) je ekstracelularni glukoprotein matriksa koji se ubraja u trombospondinsku skupinu proteina koji vežu kalcij. Čini se da ima ulogu u stabilizaciji matriksa To je najčešće istraživani biomarker za OA i u različitim studijama potvrđen kao potencijalni dijagnostički i prognostički parametar te indikator težine i ishoda liječenja OA (10). Smatra se da ga je zbog njegovih karakteristika najispravnije kategorizirati kao marker pregradnje hrskavice (11). Razina COMP u serumu obrnuto je proporcionalna, a razina neoepitopa kolagena tipa II razgrađenog kolegenazom (C2C) korelira s debljinom hrskavice koljena (12). Poznate su dnevne varijacije razine biomarkera u serumu i urinu. Na temelju određivanja nekih biomarkera u malog broja bolesnika s OA koljena utvrđeno je da je najoptimalnije uzimati biološke uzorke oko ili nešto iza 12 sati i to u serumu HA, COMP, keratan sulfat (KS-5D4), faktor rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) i karboksi-terminalni prokolageni propeptid tip II (PIICPI), a u urinu CTX-II i C2C (13). Rezultati ove i drugih studija još se moraju potvrditi na velikom broju bolesnika te standardizacijom načina i doba dana uzimanja krvi i urina.

Koncentracija biomarkera ovisi i o fizičkoj aktivnosti jer ona mijenja metabolizam hrskavice. U bolesnika s aktivnim OA koljena (N=58) utvrđene su povećane vrijednosti COMP u serumu neposredno nakon aktivnosti. Normalizacija se postiže već 30 minuta nakon vježbi ili drugim riječima uzorke krvi primjereno je uzimati nakon 30 minuta mirovanja, a porast COMP je prolazni efekt povezan s mehaničkim opterećenjem (14).

Nekoliko je primjera pokušaja primjene antiresorptivnih lijekova za osteoporozi kod OA s idejom kontrole

degradacijskih procesa u zglobovima. U ovim istraživanjima nedostaje jasna radiološka potvrda njihova učinka na širinu zglobne pukotine iako rizedronat, kalcitonin i stroncijev ranelat smanjuju razinu uCTX-II za oko 20% (15,16,17).

Nedavno je objavljen BIPED (Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention, Diagnostic) koncept klasifikacije biomarkera ili bolje rečeno zahtjevi u odnosu na kliničke i istraživačke potrebe (18). Izdvojeno je 5 kategorija biomarkera: 1. dijagnostički biomarkeri; 2. biomarkeri koji određuju težinu OA; 3. biomarkeri koji ocjenjuju djelotvornost terapije; 4. prognostički biomarkeri; 5. eksperimentalni biomarkeri.

Od dijagnostičkih biomarkera očekuje se potvrda bolesti i korelacija s radiološkom dijagnozom OA, stadij ≥ 2 prema Kellgren-Lawrenceu. U dosadašnjim nastojanjima nije izdvojen niti jedan takav marker. Laboratorijski pokazatelj težine OA trebao bi odrediti aktivnost i opsežnost procesa u promatranom trenutku za promatrani zglob, a ne za više zglobova. Za sada COMP (19), HA (20), i CTX-II (21) zadovoljavaju ove zahtjeve. Ocjena djelotvornosti terapije presudna je za kliničara. Određivanje koncentracije biomarkera prije i za vrijeme liječenja još uvijek je u eksperimentalnoj fazi jer ne postoje lijekovi koji modificiraju tijek OA. Prognostički markeri predviđaju razvoj OA kod zdravih i tijek/ishod bolesti u oboljelih. U budućnosti se mnogo očekuje od genotipizacije koja bi diskriminirala potencijalne bolesnike od onih koji to neće postati. Povećana razina COMP i CTX-II povezana je s radiološki progresivnim oblikom OA (22). Brojna istraživanja u području metabolizma zgloba provode se s ciljem validacije poznatih i otkrivanja novih biomarkera za OA.

Zaključno, otkrivene su mnoge molekule kao mogući biokemijski indikatori OA, ali je još nejasno koju strukturu i koju fazu patofiziološkog procesa predstavljaju niti je dogovorena njihova klasifikacija. Vrijeme uzimanja biološkog uzorka tijekom dana, metode analize i referentne vrijednosti su otvorena pitanja koja zahtijevaju standardizaciju postupaka i validaciju rezultata. Analiza biomarkera metabolizma zgloba nije indicirana u rutinskom radu jer ne doprinosi dijagnozi, ocjeni težine bolesti, odabiru terapijske strategije, ishodu niti prognozi bolesti. Za dijagnozu i praćenje bolesnika s OA i dalje je presudna radiološka dijagnoza i klinički ishod bolesti. Od svih biokemijskih markera jedino su uCTX-II, HA i COMP potencijalni pokazatelji aktivnosti degenerativne bolesti zgloba.

Literatura

1. Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum* 2000;43:953-68.

2. Tetlow LC, Adlam DJ, Wooley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine produc-

tion by chondrocytes of human osteoarthritis cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001;44:585-94.

3. Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Banes AJ, Guilak F. The effects of static and intermittent compression on nitric oxide producti-

on in articular cartilage explants. *J Orthop Res* 2001;19:729-737.

4. Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of oateoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;227 (doi: 10.1186/ar2655).

5. Garnero P. Osteoarthritis: biological markers for the future? *J Bone Spine* 2002;69:525-30.

6. Sharif M, Kirwan J, Charni N. i sur. A 5-yr longitudinal study of type IIA collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis-association with disease progression. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:938-43.

7. Garnero P, Mazières B, Guéguen A. i sur. Cross-sectional association of 10 molecular markers of bone, cartilage, and synovium with disease activity and radiological joint damage in patients with hip osteoarthritis: the ECHODIAH cohort. *J Rheumatol* 2005;32:697-703.

8. Takahashi M, Naito K, Abe M. i sur. Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R208-12.

9. Bruyere O, Collette J, Kothari M. i sur. Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1050-4.

10. Tseng S, Reddi AH, Di Cesare PE. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): A biomarker of arthritis. *Biomarker Insights* 2009;4:33-44.

11. Felson DT, Lohmander LS. Whither osteoarthritis biomarkers? *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17: 419-22.

12. King KB, Lindsey CT, Dunn TC. i sur. A study of the relationship between molecular biomarkers of joint degeneration and the magnetic resonance-measured characteristics of cartilage in 16 symptomatic knees. *Magn Reson Imaging* 2004;22:1117-23.

13. Kong SY, Stabler TV, Criscione LG. i sur. Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2496-504.

14. Andersson ML, Thorstensson CA, Roos EM. i sur. Serum levels of cartilage oligomeric matrix prote-

in (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disord* 2006;7:98.

15. Bingham III CO, Buckland-Wright JC, Garnero P. i sur. Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: Results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum* 2006;54: 3494-507.

16. Manicourt DH, Azria M, Mindeholm L. i sur. Oral salmon calcitonin reduces Lequesne's algofunctional index scores and decreases urinary and serum levels of biomarkers of joint metabolism in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;5:3205-11.

17. Alexandersen P, Karsdal MA, Qvist P. i sur. Strontium ranelate reduces the urinary level of cartilage degradation biomarker CTX-II in postmenopausal women. *Bone* 2007;40:218-22.

18. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB. i sur. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:723-7.

19. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB. i sur. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 1999;42: 2356-64.

20. Elliott AL, Kraus VB, Luta G. i sur. Serum hyaluronan levels and radiographic knee and hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum* 2005;52:105-11.

21. Garnero P, Sornay-Rendu E, Arlot M. i sur. Association between spine disc degeneration and type II collagen degradation in postmenopausal women: the OFELY study. *Arthritis Rheum* 2004;50:3137-44.

22. Garnero P, Peterfy C, Zaim S, Schoenharth M. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2822-9.