

ออสตีโอแคลซิน - ดรรชนีใหม่ใน การบ่งชี้ถึงการสร้างกระดูก

สุนทร ไกรสุวรรณ*
วิทยา ศรีดามา**

Kraisuwan S, Sridama V. Osteocalcin - a new index of bone formation. Chula Med J 1991 Oct; 35(10): 677-685

Osteocalcin is a calcium-binding protein. Measurement of its level in the blood or urine is a biological index of bone formation or osteoblastic activity. Alkaline phosphatase and urinary hydroxyproline are used to obtain this biological index. However, these markers may be altered in diseases other than bone diseases. Osteocalcin is a new index for the differential diagnosis of bone diseases and a tool for better understanding the pathogenesis of bone diseases.

Osteocalcin levels are elevated in diseases in which other markers are also elevated; these diseases include hyperparathyroidism, Paget's disease, multiple myeloma and cancer. Osteocalcin levels are also elevated in conditions in which other markers are normal; these include postmenopausal osteoporosis and subclinical hyperthyroidism. However, osteocalcin levels are also increased in renal failure, the luteal phase of menstruation and during the nocturnal period. Decreased levels were found during pregnancy, in liver disease and after alcoholic ingestion.

Key words : Osteocalcin, bone formation

Reprint request : Sridama V, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. August 20, 1991.

Osteocalcin หรือ bone gamma-carboxyglutamic acid containing protein (Bone Gla Protein, BGP) คือ vitamin-K dependent, calcium-binding protein ของกระดูก⁽¹⁾ สามารถจับตัวกับ hydroxyapatite ได้ดี ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่า osteocalcin สามารถใช้เป็น ธรรมชาติของ bone formation ที่ดี⁽²⁻⁹⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับ ธรรมชาติที่เคยมี เช่น ระดับ alkaline phosphatase ใน เลือด⁽¹⁰⁻¹¹⁾ และระดับ hydroxyproline ในปัสสาวะ⁽¹²⁾

1. โครงสร้างของกระดูก⁽¹³⁾

กระดูกประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ cellular และ extracellular component

ก. cellular component ประกอบด้วย

1. osteoblast ทำหน้าที่สร้าง organic matrix เช่น type I collagen, osteocalcin, osteopontin
2. osteocyte คือ osteoblast ที่ถูกล้อมรอบด้วย bone matrix
3. osteoclast คือ multinucleated cell เกิดจากการรวมตัวกันของ hematopoietic cell ทำหน้าที่เกี่ยวกับ bone resorption

ข. extracellular component ประกอบด้วย

1. organic material ได้แก่
 - Type I collagen
 - non collagenous protein เช่น osteocalcin, osteonectin, osteopontin, serum protein เป็นต้น
2. solid mineral phase ได้แก่ Calcium, Magnesium, phosphate, sodium เป็นต้น

2. การประเมิน activity ของ bone metabolism

การประเมินเมตาบอลิซึมของกระดูก ยังคงเป็น ปัญหา^(6,8) แต่เดิมมีการใช้ระดับ alkaline phosphatase ในเลือด^(10,11) และ hydroxyproline⁽¹²⁾ ในปัสสาวะเพื่อใช้เป็นธรรมชาติ แต่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจาก

ก. alkaline phosphatase สามารถสร้างได้จากหลายอวัยวะ ได้แก่ ตับ ลำไส้ รก และเนื้อเยื่อบางชนิด⁽¹⁰⁾

ข. hydroxyproline มีการเปลี่ยนแปลงตาม non-osseous collagen⁽¹²⁾ ด้วย

ดังนั้นจึงมีการศึกษา การใช้ osteocalcin ซึ่งเป็น non-collagenous protein ที่มีปริมาณมากที่สุดในกระดูก

เพื่อใช้เป็นธรรมชาติของเมตาบอลิซึมของกระดูกมากขึ้น เนื่องจากน่าจะมีความจำเพาะต่อกระดูกมากกว่า จากหลักฐาน ดังต่อไปนี้

- ก. osteocalcin สร้างจาก osteoblast⁽¹⁴⁾
- ข. ระดับสูงขึ้นในสัตว์ทดลองที่เจริญเติบโตรวดเร็ว และในเด็ก^(15,16)
- ค. ขณะได้รับ warfarin ตรวจพบ undercarboxylated osteocalcin และเมื่อให้วิตามินเค พบว่า osteocalcin กลับมาเป็นปกติ⁽¹⁷⁾
- ง. ระดับ osteocalcin มีการเปลี่ยนแปลง สัมพันธ์กับความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับกระดูก^(6,9,18)
- จ. การเปลี่ยนแปลงระดับในเลือด สัมพันธ์กับระดับ alkaline phosphatase^(16,19)
- ฉ. มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของกระดูก^(11,20)

3. โครงสร้างของ osteocalcin

osteocalcin เป็น single chain protein มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 5,800 ประกอบด้วย 49 amino acid และ 1 disulfide bond เชื่อมระหว่างตำแหน่งที่ 23 และ 29 มี gamma-carboxyglutamic acid (Gla) ซึ่งทำหน้าที่เป็น calcium binding amino acid 3 โมเลกุล ที่ตำแหน่ง 17, 21 และ 24⁽²¹⁻²²⁾

4. การสร้าง osteocalcin

สร้างจาก osteoblast⁽¹⁴⁾ มี gene ที่ควบคุมการสร้างอยู่บน long arm ของโครโมโซม คู่ที่ 1 เช่นเดียวกับ gene ของ alkaline phosphatase⁽²³⁾

DNA จะสร้าง mRNA เพื่อสร้าง amino acid ที่จำเป็นสำหรับการสร้าง preproosteocalcin ประกอบด้วย 99 amino acids ต่อมาจะผ่านขบวนการต่าง ๆ เปลี่ยน preproosteocalcin เป็น proosteocalcin และ osteocalcin ตามลำดับ⁽²⁴⁾

Osteocalcin จะผ่านขบวนการ gamma carboxyglutamation เพื่อเปลี่ยน glutamic acid เป็น gamma-carboxyglutamic acid โดยอาศัยวิตามินเค และ CO₂-dependent carboxylase⁽²⁴⁾ เกิดเป็น Gla residue ในโมเลกุลของ osteocalcin ผลที่เกิดขึ้นทำให้ osteocalcin มีคุณสมบัติจับกับ calcium และ hydroxyapatite ได้ดี เกิด bone

formation โดย 1 มก. ของ osteocalcin สามารถจับ hydroxyapatite ได้ 17 มก.

ในภาวะขาดวิตามินเค หรือได้รับ warfarin จะยับยั้งการสังเคราะห์ Gla⁽²⁵⁾ ทำให้เกิด undercarboxylated protein และลดการจับตัวกับ hydroxyapatite

5. เมตะบอลิซึมของ osteocalcin

ประมาณร้อยละ 10-25 ของ osteocalcin ที่ถูกสร้างขึ้น จะถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด⁽⁸⁾ และถูกทำลายที่ไต^(19,26,27) จากนั้นจะขับออกจากร่างกายในรูปของ free Gla ในปัสสาวะ (UGla) พบว่า ระดับของ UGla แปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับ osteocalcin ในเลือด

6. การตรวจหา osteocalcin

สามารถตรวจได้ด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA)⁽²⁸⁾ และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)⁽²⁹⁾

การตรวจด้วยวิธี RIA ของแต่ละสถาบันมีค่าแตกต่างกัน แล้วแต่ชนิดของ antibody ที่ใช้ว่าเป็น polyclonal หรือ monoclonal antibody⁽²⁸⁾ ดังนั้นค่าปกติของแต่ละสถาบันจึงไม่เท่ากัน⁽⁸⁾ มีผู้เสนอว่า การรายงานค่า osteocalcin ควรบอกเป็นจำนวนร้อยละ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าในคนปกติของสถาบันนั้น⁽³⁰⁾ และบอกชนิดของ fragment ที่วัดด้วย⁽⁸⁾

ค่าปกติโดยเฉลี่ยในผู้ใหญ่ = 7.0 ± 2.5 ng/ml

การวัดระดับ osteocalcin ต้องคำนึงปัจจัยที่อาจทำให้ค่าเปลี่ยนแปลงไป⁽⁸⁾ ได้แก่

ก. ปริมาณซีรัมที่ใช้ ถ้ามากกว่า 200 ul จะเพิ่ม non-specific binding ต่อโปรตีนชนิดอื่นด้วย

ข. ภาวะ hemolysis และ lipemia จะทำให้ค่าต่ำกว่าปกติ

ค. อุณหภูมิที่เปลี่ยนไป ดังนั้นจึงควรปั่นเลือดในที่เย็น และตรวจวัดค่าภายใน 2-3 ชั่วโมง

จากปัญหาเรื่องมาตรฐานของระดับ osteocalcin ดังกล่าว ได้มีการศึกษาโดยใช้ปริมาณของ UGla พบว่าการตรวจด้วยวิธี mid molecule specific human osteocalcin RIA พบว่าปริมาณ UGla มีความสัมพันธ์กับ alkaline phosphatase และ osteocalcin ในเลือด⁽²⁷⁾ และสามารถขจัดปัญหาเรื่อง diurnal variation ได้ โดยการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง⁽³¹⁾

อย่างไรก็ตาม พบว่า UGla มีค่าแตกต่างกันตามอายุ และอาจมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากสาเหตุอื่นได้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ clotting factor เนื่องจากร้อยละ 75 ของ UGla มาจาก vitamin K dependent clotting protein⁽¹⁾

มีรายงานการใช้ประโยชน์ของ UGla ในบางภาวะ เช่น ใช้ติดตามการรักษาผู้ป่วย osteoporosis⁽³²⁾ ในผู้ป่วย dermatomyositis และ scleroderma พบว่า UGla เพิ่มขึ้น ในขณะที่ osteocalcin ในเลือดไม่เปลี่ยนแปลง⁽⁸⁾

7. การเปลี่ยนแปลงที่มีผลต่อระดับ osteocalcin

ก. อายุ^(9,15,16) พบระดับสูงสุดในวัยรุ่น หลังจากนั้นระดับ osteocalcin จะลดลง ยกเว้นในบางภาวะ เช่น หญิงหลังหมดประจำเดือน พบมีระดับสูงขึ้น⁽³³⁾

ข. เพศ มีรายงานแตกต่างกัน ทั้งที่ระดับในชายสูงกว่าหญิง⁽³⁴⁾ หญิงสูงกว่าชาย⁽¹⁵⁾ และพบระดับเท่ากัน⁽⁹⁾

ค. Diurnal variation ระดับจะต่ำในตอนเช้า และมีค่าสูงขึ้นในตอนกลางคืน^(35,36) อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ bone formation

ง. อาหาร

ถ้ามีฟอสเฟตในอาหารสูง จะทำให้ระดับ osteocalcin เพิ่มขึ้น อาจเกิดเนื่องจากการเพิ่มระดับ parathyroid hormone⁽⁸⁾

แมกนีเซียม เพิ่มระดับ osteocalcin เนื่องจากยับยั้งการจับตัวระหว่าง osteocalcin และ hydroxyapatite⁽³⁷⁾

แอลกอฮอล์ ลดระดับ osteocalcin แบบ dose dependent⁽³⁸⁾

จ. การทำหน้าที่ของไต

เมื่อระดับ glomerular infiltration rate ลดลง เหลือน้อยกว่า 30 มล./นาที/1.73 ม² หรือระดับ creatinine มากกว่า 1.8 มก./ดล. (160 ไมโครโมล/ลิตร) ระดับ osteocalcin จะเพิ่มขึ้น 2-200 เท่า⁽³⁹⁾

การเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยที่ได้รับการล้างไตพบว่า osteocalcin ถูกกำจัดได้ด้วยการทำ peritoneal dialysis แต่ไม่เปลี่ยนแปลงด้วยการทำ hemodialysis⁽⁴⁰⁾

การเปลี่ยนไตพบว่า หลังการผ่าตัดเปลี่ยนไต ระดับ osteocalcin จะลดลงในระยะเวลา 60-90 วัน⁽⁴¹⁾ โดยมีความ

สัมพันธ์โดยตรงกับระดับ alkaline phosphatase และ parathyroid hormone

ฉ. โรคตับ

Osteocalcin ต่ำลงในโรคตับแข็ง อาจเกิดจากการลด bone formation แต่ไม่เปลี่ยนแปลงในภาวะ fatty liver^(43,44)

8. ผลของระบบต่อมไร้ท่อต่อ osteocalcin

ก. วิตามินดี 3

สามารถกระตุ้นการสร้าง osteocalcin โดยพบ 1, 25 (OH)₂ D₂ receptor ใน osteocalcin gene⁽⁴⁵⁾ และในภาวะขาด vitamin D พบระดับ osteocalcin ในเลือดและกระดูกลดลงร้อยละ 50-70⁽⁴⁶⁾ ผลกระตุ้นนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยสารหลายชนิด ได้แก่ interleukin-I, tumor necrosis factor, parathyroid hormone และ prostaglandin E₂⁽⁴⁷⁾

ข. Parathyroid hormone

ในระยะแรกจะลดการสร้าง osteocalcin โดยลดการทำงานของ osteoblast⁽⁴⁸⁾ ในระยะต่อมาจะเพิ่ม bone turnover ดังนั้นระดับ osteocalcin จะสูงขึ้น เช่น ภาวะ chronic hyperparathyroidism

การผ่าตัดต่อมพาราไทรอยด์ในผู้ป่วย hyperparathyroidism พบว่า ระดับ osteocalcin^{7,49)} ลดลง

ค. Calcitonin

ไม่มีผลต่อการสร้าง osteocalcin แต่พบว่าในผู้ป่วย Paget's disease และ osteoporosis ที่รักษาด้วย calcitonin มีระดับ osteocalcin ลดลง⁽⁸⁾

ง. รอบประจำเดือน

พบระดับ osteocalcin สูงขึ้นใน luteal phase ของรอบประจำเดือน⁽⁵⁰⁾

จ. ภาวะตั้งครรภ์

ตั้งแต่ไตรมาสแรก ระดับ osteocalcin จะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 ของค่าปกติ⁽⁵¹⁾ และมีระดับสูงขึ้นภายหลังคลอดแล้ว 48 ชั่วโมง อาจเกิดจากถูกกำจัดโดยรกซึ่งแตกต่างจากระดับ alkaline phosphatase ที่มีค่าสูงในไตรมาสที่ 3 มากกว่าในระยะแรกของการตั้งครรภ์⁽⁵²⁾ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ osteocalcin เป็นเครื่องหมายของเมตาบอลิซึมของกระดูกในคนท้อง

ฉ. เบาหวาน

ในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวาน พบการสร้าง osteocalcin ลดลง⁽⁵³⁾ และไม่ตอบสนองต่อการได้รับ vitamin D₃ และถ้าตั้งครวรรดับจะต่ำกว่าสัตว์ทดลองที่ไม่เป็นเบาหวาน⁽⁵⁴⁾

ช. Corticosteroid^(48,55,56,57)

การรักษาด้วย exogenous corticosteroid ทั้งระยะสั้น และระยะยาว จะยับยั้งการสร้าง osteoblast ทำให้ระดับ osteocalcin ลดลง แต่ stanozolol ซึ่งเป็น anabolic steroid ทำให้ระดับ osteocalcin เพิ่มขึ้น

การบริหารยาด้วยวิธีพ่น ไม่ทำให้ระดับ osteocalcin ลดลง⁽⁵⁸⁾

ซ. Growth Hormone (GH)

ในภาวะขาด GH osteocalcin อาจปกติหรือต่ำกว่าปกติ และจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการรักษาด้วย GH⁽³⁶⁾ ใน acromegaly ระดับ osteocalcin จะเพิ่มขึ้นและลดลงหลังการรักษา⁽⁵⁹⁾

ด. Thyroid Hormone

hyperthyroid เพิ่มระดับ osteocalcin จากการเพิ่ม bone resorption⁽⁵⁶⁾ ร่วมกับภาวะ hypercalcemia, hypercalciuria และ osteoporosis^(30,60)

มีรายงานระดับ osteocalcin สูงขึ้น ใน non toxic goitre ที่มีระดับ TSH ต่ำ แสดงว่าผู้ป่วยมี bone resorption เพิ่มขึ้น และอยู่ในภาวะ subclinical hyperthyroidism⁽⁶¹⁾

9. ผลของวิตามินเคต่อ osteocalcin

วิตามินเค มีความสำคัญต่อการสร้าง osteocalcin^(1,62) ดังกล่าวข้างต้นพบว่า ในภาวะที่ขาดวิตามินเค หรือได้รับ warfarin หรือ phenytoin หรือผู้ป่วย genetic epoxide reductase enzyme deficiency⁽⁶³⁾ พบว่า การเกิด undercarboxylated protein และลดการจับของ calcium ต่อกระดูก⁽²⁵⁾

ในผู้ป่วยที่ได้รับ warfarin เป็นระยะเวลานาน ไม่พบว่ามีผลต่อโครงสร้างของกระดูก⁽²⁵⁾ อาจเนื่องจากในขนาดที่ใช้รักษา ไม่มีผลต่อ osteocalcin แต่พบว่าทำให้วิตามินเคในผู้หญิงหลังหมดประจำเดือนแล้วพบระดับ osteocalcin เพิ่มขึ้น⁽⁶⁴⁾

ในทารกที่มารดาได้รับ warfarin ในไตรมาสแรก พบว่า มีอุบัติการณ์ของความผิดปกติเกี่ยวกับกระดูกเพิ่มขึ้น⁽⁶²⁾ เช่น hypoplastic saddle nose และความผิดปกติของกระดูกสันหลัง เป็นต้น

10. Osteocalcin ในภาวะที่มีโรคของกระดูก

ก. Paget's disease

เป็นโรคที่มี bone turnover สูง ดังนั้นระดับ osteocalcin จะสูง แต่พบว่า alkaline phosphatase เป็นเครื่องหมายที่ไวกว่า⁽⁶⁵⁾

อาจใช้ osteocalcin ในการติดตามการรักษา เช่น หลังการได้รับ calcitonin⁽⁸⁾

ข. Osteoporosis

เป็นภาวะที่พบบ่อยในหญิงหลังหมดประจำเดือน และการวินิจฉัยในระยะแรกทำได้ยาก พบว่า osteocalcin มีระดับสูงขึ้น พร้อมกับการพบความหนาแน่นของกระดูกลดลง⁽⁶³⁾ และพบ total calcium, phosphate ในร่างกายลดลง⁽⁶⁶⁾ เพราะฉะนั้น osteocalcin อาจนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจ โดยพิจารณาร่วมกับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด osteoporosis เพื่อการวินิจฉัยในระยะแรก

การรักษาด้วย estrogen พบว่า ระดับ osteocalcin ลดลง^(67,68)

ค. Chronic Rheumatic Disease

ในเด็กที่มี chronic rheumatic disease เช่น juvenile arthritis, systemic lupus erythematosus, juvenile dermatomyositis พบ osteocalcin ต่ำลงใน active phase และสูงขึ้นใน inactive phase แม้ว่าจะได้รับการรักษาด้วย steroid⁽⁴⁾

ในผู้ใหญ่มีรายงานที่แตกต่างกัน พบระดับ osteocalcin ในเลือด และจากน้ำเจาะข้อมีค่าต่ำลงในผู้ป่วย osteoarthritis และ rheumatoid arthritis^(3,5) หรืออาจพบว่ามีค่าเท่ากับในคนปกติ^(2,69)

ง. Multiple Myeloma

ระดับของ osteocalcin แปรผกผันกับความรุนแรงของ lytic bone lesion พบว่ามีค่าต่ำใน severe, extensive lytic bone lesion, recurrent hypercalcemia และในกลุ่มผู้ป่วยที่การทำนายโรคไม่ดี⁽⁷⁰⁾

จ. มะเร็ง

มีรายงานที่แตกต่างกันเกี่ยวกับระดับ osteocalcin ในภาวะ hypercalcemia ที่พบในโรคมะเร็ง อาจเนื่องมาจากกลไกการเกิดแตกต่างกัน^(8,71)

ในมะเร็งที่มีการกระจายไปที่กระดูกแล้ว จะพบระดับ osteocalcin เพิ่มขึ้น⁽⁷²⁾

11. ประโยชน์ของ osteocalcin ในเวชปฏิบัติ

ก. ใช้บอกพยากรณ์กำเนิดของโรคต่าง ๆ

โดยวัดระดับ osteocalcin ซึ่งเป็นเครื่องหมายของ bone turnover เพื่ออธิบายพยากรณ์กำเนิดของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระดูก เช่น osteoporosis ที่เกิดในหญิงหลังหมดประจำเดือน,^(63,66) renal osteodystrophy,⁽³⁹⁾ osteopenia ในภาวะ hyperthyroidism,^(56,60) congenital anomaly ใน fetal warfarin syndrome⁽⁶²⁾, เด็กตัวเล็ก และโครงสร้างกระดูกปกติในมารดาที่ใช้ยาเสพติด⁽⁷³⁾

ข. ใช้ในการวินิจฉัยโรค

มีรายงานการใช้ระดับ osteocalcin เพื่อการวินิจฉัยโรคในระยะแรกก่อนจะพบอาการ และอาการแสดงอย่างอื่น เช่น osteoporosis ในหญิงหลังหมดประจำเดือน,⁽⁶³⁾ ในภาวะต่อมธัยรอยด์เป็นพิษ ชนิด subclinical⁽⁶¹⁾

ค. ใช้บอก activity และการกระจายของโรค

ได้แก่ - การบอก activity ใน chronic rheumatic disease,^(4,5) Paget's disease⁽⁶²⁾
- บอกการกระจายไปที่กระดูกในผู้ป่วยมะเร็ง⁽⁷²⁾

ง. ใช้เพื่อติดตามการรักษา

ได้แก่ - หลักการทำ parathyroidectomy ใน hyperparathyroidism^(7,49)
- การรักษา Paget's disease ด้วย calcitonin^(74,8)
- หลังการรักษา GH-deficiency⁽³⁶⁾ หรือ acromegaly⁽⁵⁹⁾
- การรักษาด้วย estrogen ใน osteoporosis^(67,68)

12. บทสรุป

Osteocalcin เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติจับกับแคลเซียม การตรวจระดับในเลือด หรือในปัสสาวะ สามารถ

43. Pietschmann P, Resch H, Muller C, Woloszczuk W, Willveonseder R. Decreased serum osteocalcin levels in patients with liver cirrhosis. *Bone Miner* 1990; 8: 103-8
44. Resch H, Pietschmann P, Krexne E, Woloszczuk W, Willvonseder R. Peripheal bone mineral content in patients with fatty liver and hepatic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25(4): 412-6
45. Demay MB, Gerardi JM, Deluca HF, Kronenberg HM. DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxy vitamin D₃ receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxy vitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 369-73
46. Lian JB, Carnes DL, Glimcher MJ. Bone and serum concentrations of osteocalcin as a function of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ circulation levels in bone disorders in rats. *Endocrinology* 1987 May; 120(5): 2123-30
47. Evans DB, Thavarajah M, Kanis JA. Involvement of prostaglandin E₂ in the inhibition of osteocalcin synthesis by human osteoblast-like cells in response to cytokines and systemic hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 194-202
48. Garrel DR, Delmas PD, Malaval L, Tourniaire J. Serum bone Gla protein: a marker of bone turnover in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 May; 63(5): 1052-5
49. Fanti P, Smith A, Price PA, Reitz RE, Malluche HH. Effects of parathyroidectomy on circulating levels of 1,25-dihydroxy vitamin D and bone Gla protein in dialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 May; 62(5): 869-73
50. Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilder L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 May; 70(5): 1431-7
51. Martinz ME, de Pedro C, Catalan P, Salinas M, Balaguer G, Ordas J. Levels of osteocalcin in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985 Nov 15; 153(6): 708-9
52. Rodin A, Duncan A, Quartero HW, Pistofidis G, Mashiter G, Whitaker K, Crook D, Stevenson TC, Chapman MG, Fogelman I. Serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 Jun; 68(6): 1123-7
53. Verhaeghe J, Suiker AM, Nyomba BL, Visser WJ, Einhorn TA, Dequeker J, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology* 1989 Feb; 124(2): 573-82
54. Verhaeghe J, Van Herch E, Van Bree R, Van Assche FA, Bouillon R. Osteocalcin during the reproductive cycle in normal and diabetic rats. *J Endocrinol* 1989 Jan; 120(1): 143-51
55. Peretz A, Praet IP, Bosson D, Rozenberg S, Bourdoux P. Serum osteocalcin in the assessment of corticosteroid induced osteoporosis. Effect of long and short term corticosteroid treatment. *J Rheumatol* 1989 Mar; 16(3): 363-7
56. Lukert BP, Higgins JC, Stoskopf MM. Serum osteocalcin increased is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 May; 62(5): 1056-8
57. Reid IR, Chapman GE, Fraser TRC, Davies AD, Surus AS, Meyer J, Hug NL, Ibbertson HK. Low serum osteocalcin levels in glucocorticoid-treated asthmatic. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 Feb; 62(2): 379-83
58. Hodsmann AB, Toogood JH, Jennings B, Fraher LJ, Baskerville JC. Differential effect of inhaled budesonide and oral prednisolone on serum osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 Mar; 72(3): 530-40
59. Johansen JS, Pedersen SA, Jorgensen JO, Riis BJ, Christiansen C, Christiansen JS, Skakkebaek NE. Effect of growth hormone on plasma bone Gla protein in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Apr; 70(4): 916-9
60. Lukert BP, Higgins JC, Stoskopf MM. Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 May; 62(5): 1056-8
61. Faber J, Perrild H, Johansen JS. Bone Gla protein and sex hormonebinding globulin in nontoxic goiter: parameters for metabolic status at the tissue level. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Jan; 70(1): 49-55
62. Hall JG, Pauli RM, Wilson KM. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med* 1980 Jan; 68(1): 122-40
63. Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Increased in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in woman. *J Clin Invest* 1983 May; 71(5): 1316-21

64. Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern Med* 1989 Dec 15; 111(12): 1001-5
65. Wilkinson MR, Wagstaffe C, Delbridge L, Wisewan J, Posen S. Serum osteocalcin concentrations in Paget's disease of bone. *Arch Intern Med* 1986 Feb; 146(2): 268-71
66. Yasumura S, Aloia J, Gundberg CM, Yeh J, Vaswani AN, Yuen K. Serum osteocalcin and total body calcium in normal pre-and postmenopausal women and postmenopausal osteoporotic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 Apr; 64(4): 681-5
67. Zerwekh JE, Sakhaee K, Pak CYC. Short-term 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration raises serum osteocalcin in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 Mar; 60(3): 615-7
68. Duda RJ Jr., Kumar R, Nelson KI, Zinsmeister AR, Mann KG, Riggs BL. 1,25-Dihydroxyvitamin D stimulation test for osteoblast function in normal and osteoporotic postmenopausal women. *J Clin Invest* 1987 Apr; 79(4): 1249-53
69. Pietschmann P, Machold KP, Woloszczuk W, Smolen JS. Serum osteocalcin concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheuma Dis* 1989 Aug; 48(8): 654-7
70. Bataille R, Delmas PD, Chappard D, Sany J. Abnormal serum bone Gla protein levels in multiple myeloma. Crucial role of bone formation and prognostic implication. *Cancer* 1990 Jul; 66(1): 167-72
71. Delmas PD, Demiause B, Malaval L, Chapuy MC, Edouard C, Meunier PJ. Serum bone gamma carboxyglutamic acid-containing protein in primary hyperparathyroidism and in malignant hypercalcemia. *J Clin Invest* 1986 Mar; 77(3): 985-91
72. Shih WJ, Wierzbinski B, Collins J, Magoun S, Chen IW, Ryo UY. Serum osteocalcin measurements in prostate carcinoma patients with skeletal deposits shown by bone scintigram: comparison with serum PSA/PAP measurements. *J Nucl Med* 1990 Sep; 31(9): 1486-9
73. Chung KS, Bezeaud A, Goldsmith JC, McMillan CW, Menache D, Robets HR. Congenital deficiency of blood clotting factors II, VII, IX and X *Blood* 1979 Apr; 53(4): 776-87
74. Mulder H, Schop C, Koster JC. Influence of pharmacological doses of calcitonin on serum osteocalcin concentration on patients with Paget's disease of the bone. *Acta Endocrinol* 1989 Jun; 120(6): 721-3