

## 5

## Marqueurs biochimiques du remodelage osseux

L'ostéoporose est une affection qui se caractérise par des modifications légères de l'activité de remodelage osseux conduisant à une perte conséquente sur une longue période. De ce fait, un marqueur du remodelage osseux doit être spécifique de l'os et sensible à de faibles variations de l'équilibre entre résorption et formation. Pour une utilisation large, il faudrait encore qu'il soit facile à prélever, à stocker et à mesurer, et insensible à des facteurs de confusion potentiels comme les habitudes alimentaires, le statut endocrinien et le rythme nyctéméral.

Certaines données suggèrent que l'évaluation du remodelage osseux à l'aide de marqueurs sériques et/ou urinaires, spécifiques des activités de formation et de résorption osseuses, devrait être mise en œuvre afin de disposer d'une évaluation de la perte osseuse (Hansen et coll., 1991) (Tableau 5.1).

### Marqueurs de l'ostéoformation

Ce sont des produits de l'activité cellulaire ostéoblastique entrant dans la circulation. Les plus utilisés sont la phosphatase alcaline sérique et l'ostéocalcine.

#### Phosphatase alcaline sérique

L'activité phosphatase alcaline sérique totale manque de spécificité et de sensibilité ; elle mesure l'activité d'iso-enzymes provenant du foie, de l'os (les deux sources principales de cette enzyme), du rein et de la rate. Les deux iso-enzymes principales (foie et os) peuvent être distinguées par des techniques très lourdes de dosages radio-immunologiques faisant appel à des anticorps monoclonaux.

**Tableau 5-1 – Marqueurs biochimiques de l'ostéof ormation et de la résorption osseuse**

Turn-over osseux	Marqueur osseux	Fluide	Commentaire
	Phosphatase alcaline	Sérum	Stimulation directe de la minéralisation via la libération de phosphore inorganique dans la matrice Stimulation indirecte de la formation des cristaux d'apatite
Ostéo-formation	Ostéocalcine	Sérum	Protéine non collagénique de la matrice osseuse produite par les ostéoblastes ; 10 à 25% passent dans la circulation
	PICP*	Sérum	Clivage à partir du procollagène avant la formation des fibrilles Quantité proportionnelle à la synthèse de la matrice osseuse
Résorption osseuse	Hydroxyproline	Urine	Produits de dégradation du collagène. Environ 30% de la quantité totale provient de cette dégradation
	Phosphatase acide tartrate résistante	Sérum	Isoenzyme osseuse, spécifique des ostéoclastes et de la résorption osseuse
	Glycoside d'hydroxylysine	Urine	Reflète la dégradation de la matrice osseuse
	Pyridinoline crosslinks	Urine	Métabolites formant des ponts avec le collagène Reflètent la quantité de collagène résorbée

\* *Procollagen Type I carboxyterminal extension peptides*

### Ostéocalcine

Il s'agit d'un petit peptide de 49 acides aminés, synthétisé uniquement par les ostéoblastes et déposé sur la matrice osseuse avec le collagène. L'ostéocalcine (ou Bone Gla Protein, BGP) est spécifique du tissu osseux et de la dentine, et sa synthèse est sous la dépendance de la vitamine K et de la dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>. Son rôle est inconnu : elle pourrait agir comme agent chimiotactique pour les ostéoblastes sur les lieux de la résorption osseuse (Price et coll., 1981).

Lors de sa synthèse et de son incorporation dans l'os, une petite quantité d'ostéocalcine passe dans la circulation où elle peut être dosée par radio-immunologie. D'autre part, l'ostéocalcine est un marqueur du turnover osseux lorsque le remodelage est couplé, c'est-à-dire lorsque la formation et la résorption osseuse sont elles-mêmes couplées. En revanche, lorsqu'il y a découplage entre ces deux processus, elle constitue un marqueur de l'ostéof ormation (Delmas et coll., 1985 ; Bataille et coll., 1987).

Le taux d'ostéocalcine varie en fonction de l'âge, il augmente progressivement chez l'enfant, atteint un maximum au moment de la puberté, puis décroît chez l'adulte et se stabilise à une valeur constante (Cormier et coll.,

1993). Si au moment de la puberté, l'élévation de l'ostéocalcine est en corrélation avec la croissance du squelette, au moment de la ménopause, elle reflète l'augmentation du turn-over osseux à travers l'accroissement de la perte osseuse (Delmas et coll., 1983). Son taux revient néanmoins à la normale sous l'action des œstrogènes par voie orale ou transdermique (Johansen et coll., 1988 ; Lufkin et coll., 1992). Son dosage permet donc de suivre la réponse à un traitement. Elle est également caractéristique de situations cliniques dans lesquelles le turn-over osseux est augmenté (hyperparathyroïdisme, hyperthyroïdie, maladie de Paget...) (Delmas, 1993). Lorsqu'elle est faiblement carboxylée, l'ostéocalcine est prédictive du risque de fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF) (Szulc et coll., 1993). Sa concentration sérique est sujette à des variations en fonction du rythme circadien : elle atteint un pic durant la nuit (Pors Nielsen et coll., 1991), imposant de réaliser le prélèvement à la même heure. Son dosage nécessite une standardisation à l'aide d'un sérum contrôle pour éviter des variations assez larges d'un laboratoire à l'autre (Delmas et coll., 1990). Il existe une corrélation entre les concentrations d'ostéocalcine et l'histomorphométrie osseuse. Cette dernière, par analyse de prélèvements de crête iliaque, constitue la « mesure-étalon » de l'ostéof ormation.

### Propeptides d'extension du collagène I

Le clivage du procollagène en milieu extracellulaire résulte en la libération d'une molécule de collagène et de deux peptides d'extension porteurs, l'un d'une terminaison carboxyle (PICP), et l'autre d'une terminaison amine (PINP). Tous deux, présents dans le sang circulant où ils peuvent être dosés, sont des marqueurs de la prolifération ostéoblastique. Il existe une faible corrélation entre le PICP et les paramètres de formation histomorphométriques (Parfitt et coll., 1987). La ménopause provoque un accroissement significatif, quoique accessoire, du taux de PICP ; cependant, on ne relève pas de corrélation entre cette augmentation et la perte osseuse consécutive mesurée par ostéodensitométrie (Hassager et coll., 1993). Le PICP demeure moins sensible et moins spécifique que les marqueurs précédents, en raison peut-être de son élimination par voie hépatique (Smesrod et coll., 1990).

Les trois molécules dont il vient d'être fait mention marquent chacune une étape différente de l'ostéof ormation : la prolifération des ostéoblastes avec le PICP, la maturation de ces cellules avec la phosphatase alcaline sérique et la minéralisation de l'os avec l'ostéocalcine. Incontestablement, aujourd'hui, c'est l'ostéocalcine qui représente tout à la fois le marqueur le plus sensible et le plus simple à doser, mais ceci n'exclut pas que d'autres protéines non collagéniques puissent un jour se révéler être des marqueurs de l'ostéof ormation (Delmas, 1993).

## **Marqueurs de la résorption osseuse**

Il s'agit de deux types de produits, molécules passant dans le sang circulant et molécules excrétées dans l'urine à la suite de la résorption osseuse.

### **Calciurie et créatinurie**

Le rapport entre la calciurie et la créatinurie représente le plus simple, mais aussi le moins sensible des marqueurs de la résorption osseuse, car elle ne reflète que d'importantes variations de la résorption osseuse.

### **Hydroxyprolinurie**

L'hydroxyproline représente environ 13 % du contenu en acides aminés de la molécule de collagène (Prockop et Kivirikko, 1968). Produit de dégradation du collagène tissulaire et osseux non réutilisé pour la synthèse de nouvelles molécules, elle passe dans le sang circulant (pour 90 % sous forme acide aminé libre et acide aminé entrant dans la composition de petits peptides), est filtrée au niveau des glomérules du rein où elle est pratiquement entièrement réabsorbée. Sa dégradation, réalisée au niveau hépatique, aboutit à la formation de dioxyde de carbone et d'urée (Kivirikko, 1983 ; Lowry et coll., 1985). Environ 10 % de l'hydroxyproline passe dans le sang circulant sous forme d'acide aminé entrant dans la composition de polypeptides, rendant impossible sa filtration glomérulaire. Son dosage qui reflète la totalité de l'hydroxyproline excrétée n'a cependant qu'une faible corrélation avec la résorption osseuse ou l'histomorphométrie osseuse ainsi qu'une faible sensibilité et spécificité (Delmas, 1993).

### **Phosphatase acide tartrate résistante**

La phosphatase acide est une enzyme lysosomale présente dans l'os, la prostate, la rate, les érythrocytes et les plaquettes. Sa forme iso-enzymatique issue de l'os est résistante au L(+) tartrate. Produite au niveau osseux par les ostéoclastes, elle est libérée dans le sang où son dosage plasmatique peut être réalisé. Sa concentration augmente parallèlement à l'accroissement du turn-over osseux observé dans les maladies du métabolisme, après ovariectomie et dans le développement de l'ostéoporose vertébrale (Stepan et coll., 1983 ; Stepan et coll., 1987 ; Piedra et coll., 1989). La mise au point de dosage utilisant des anticorps monoclonaux devrait améliorer la spécificité de ce marqueur et contribuer à sa plus large utilisation (Kraezlin et coll., 1990).

### Glycosides d'hydroxylysine urinaire

L'hydroxylysine est également un produit de dégradation du collagène non réutilisé pour la synthèse de nouvelles molécules. Elle est libérée sous forme de glucoside d'hydroxylysine (GHYL) et de galactoside d'hydroxylysine. La forme glucoside est 5 à 6 fois plus concentrée dans le collagène I de l'os que dans la peau (Cormier et coll., 1993). Son dosage, pratiqué par HPLC, s'avère difficile et sa spécificité reste faible. Cependant, son excrétion urinaire sous forme galactoside s'accroît lors du vieillissement (Moro et coll., 1988a), suggérant qu'elle pourrait être un marqueur de l'ostéoporose lorsque les difficultés liées à son dosage auront été vaincues (Moro et coll., 1988b).

### Pyridinolines urinaires

La pyridinoline et la désoxypyridinoline sont sans nul doute les marqueurs de la résorption osseuse les plus prometteurs. Toutes deux forment des ponts avec la molécule de collagène (Eyre, 1987 ; Eyre et coll., 1988). Elles sont libérées lors de la dégradation de celui-ci et excrétées sous forme libre et sous forme peptidique dans l'urine où leur dosage se fait par HPLC. La pyridinoline est spécifique de l'os, des tendons, du cartilage et de la dentine ; la désoxypyridinoline est spécifique, quant à elle, de l'os et de la dentine (Eyre et coll., 1984). Leur taux est plus élevé chez l'enfant que chez l'adulte (Beardsworth et coll., 1990). Au moment de la ménopause, il s'accroît de 50 à 100 %, mais revient à la normale sous œstrogénothérapie (Uebelhart et coll., 1991). Par ailleurs, leur excrétion suit le rythme nyctéméral puisque leur concentration atteint un pic durant la nuit et au contraire, un nadir pendant l'après-midi. Ce rythme suit celui de l'ostéocalcine, traduisant par là un accroissement nocturne du turnover osseux et de la résorption (Eastell et coll., 1992). La pyridinoline et la désoxypyridinoline s'avèrent être des marqueurs du turnover osseux (ostéoporose vertébrale, maladie de Paget, hyperthyroïdisme et hyperparathyroïdisme, hypercalcémie avec métastases osseuses) et de l'histomorphométrie osseuse (ostéoporose vertébrale) (Eastell et coll., 1990 ; Delmas et coll., 1991 ; Uebelhart et coll., 1990 ; Body et coll., 1992 ; Robins et coll., 1991). Enfin, leur taux diminue après traitement par les bisphosphonates (Uebelhart et coll., 1990).

L'utilisation plus large de la pyridinoline et de la désoxypyridinoline dans l'évaluation de la résorption dépend en partie de la mise au point d'un dosage radio-immunologique, plus simple que l'actuelle HPLC. Comme pour l'ostéocalcine, les concentrations de la désoxypyridinoline diminuent sous traitement par œstrogènes après la ménopause. Les concentrations de ce produit permettraient aussi d'évaluer le niveau de résorption réel, du fait d'une bonne corrélation constatée avec les variations des mesures isotopiques par le calcium radioactif.

## Marqueurs osseux en clinique

En fonction des caractéristiques qui viennent d'être décrites, le tableau 5-II résume les possibilités offertes par l'utilisation des marqueurs osseux en clinique. Cependant, les dosages sériques ou urinaires de ces marqueurs reflètent le turnover osseux du squelette dans sa totalité. En particulier, ils ne permettent pas de faire une distinction entre le turn-over de l'os cortical et celui de l'os trabéculaire, ni de différencier l'activité cellulaire de l'activité tissulaire (Delmas, 1993). Par conséquent, on peut aisément imaginer que chacun d'entre eux représente une étape particulière du métabolisme osseux et qu'il soit nécessaire d'effectuer le dosage de plusieurs d'entre eux pour mieux apprécier la résorption et l'ostéof ormation.

**Tableau 5-II – Marqueurs osseux en clinique (d'après Delmas, 1993)**

Statut	Utilisation clinique
Ménopause	Identification des femmes à perte osseuse rapide ayant besoin d'un traitement œstrogénique ou d'un autre traitement spécifique de l'ostéoporose
Ostéoporose vertébrale	Sélection du meilleur traitement en fonction du turnover osseux
Traitement	Évaluation des effets du traitement sur la résorption et l'ostéof ormation et évaluation de la réponse de la masse osseuse à longterme
Hyperparathyroïdisme primaire	Évaluation du turnover osseux
Traitement chronique par glucocorticoïdes	Évaluation du turnover osseux
Personnes âgées	Évaluation du risque fracturaire (?)

Si le taux d'ostéocalcine reflète bien la perte osseuse mesurée deux à quatre ans plus tard par ostéodensitométrie (Slemenda et coll., 1987), le triple dosage de trois marqueurs, l'ostéocalcine, la pyridinoline et l'hydroxyproline demeure plus sensible que le simple dosage de l'ostéocalcine, permettant ainsi une meilleure évaluation de la perte osseuse à deux ans (Uebelhart et coll., 1991). D'autre part, quatre marqueurs (l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, le rapport entre la calciurie et la créatinurie et le rapport entre l'hydroxyproline et la créatinurie) ont une valeur prédictive par rapport à la perte osseuse survenant dans les douze années suivant la ménopause (Hansen et coll., 1991). Enfin, si jusqu'à présent, l'ostéocalcine faiblement carboxylée était seule prédictive du risque de fracture (Szulc et coll., 1993), les résultats de l'étude prospective française EPIDOS portant sur 7 500 femmes montrent que la pyridinoline libre et les *cross-laps*, marqueurs spécifiques de la résorption osseuse, sont prédictifs du

risque de fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF), indépendamment de la masse osseuse (Garnero et coll., 1995). Mais ce rôle d'outil prédictif de la perte osseuse n'est pas le seul joué par les marqueurs osseux qui sont également des outils permettant d'évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements. Les meilleurs exemples sont ceux de l'ostéocalcine et de la pyridinoline dont les taux, on l'a vu, diminuent après œstrogénothérapie, ce qui permet d'apprécier l'efficacité du traitement. Enfin, la meilleure valeur prédictive du risque fracturaire serait donnée, à l'heure actuelle, par une association des marqueurs biochimiques et de la mesure de DMO, afin d'estimer à la fois la résistance osseuse et la vitesse de résorption (Hansen et coll., 1991 ; Delmas, 1993).

## BIBLIOGRAPHIE

- BATAILLE R, DELMAS PD, SANY J. Serum bone gla-protein in multiple myeloma. *Cancer* 1987, **59** : 329-334
- BEARDSWORTH LJ, EYRE DR, DICKSON IR. Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxylslypyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J Bone Miner Res* 1990, **5** : 671-676
- BODY JJ, DELMAS PD. Urinary pyridinium crosslinks as markers of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **74** : 471-475
- CORMIER C, SOUBERBIELLE JC, KINDERMANS C, MENKES JC, SACHS C. Les marqueurs osseux. *Immunoanal Biol Spéc* 1993, **8** : 348-354
- DELMAS PD. Biochemical markers of bone turnover I : Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993, **95** : 11S-16S
- DELMAS PD, STENNER D, WAHNER HW, MANN KG, RIGGS LB. Increase in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in women : Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J Clin Invest* 1983, **71** : 1316-1321
- DELMAS PD, MALAVAL L, ARLOT M, MEUNIER P. Serum bone gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985, **6** : 329-341
- DELMAS PD, CHRISTIANSEN C, MANN KG, PRICE PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay for assessing standardization report. *J Bone Miner Res* 1990, **5** : 5-11
- DELMAS PD, SCHLEMMER A, GINEYTS E, RIIS B, CHRISTIANSEN C. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1991, **6** : 639-644
- EASTELL R, HAMPTON L, COLWELL A. Urinary collagen crosslinks are highly correlated with radio isotopic measurements of bone resorption. *Proceedings of the Third International Symposium on Osteoporosis*, Osteopress, Aalborg, Denmark, pp 51, 1990
- EASTELL R, CALVO MS, BURRITT MF, OFFORD KP, RUSSELL RGG, RIGGS BL. Abnormalities in circadian patterns of bone resorption and renal calcium conservation in type I osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **74** : 487-494
- EYRE DR, KOOB TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984, **137** : 380-388

- EYRE DR. Collagen crosslinking aminoacids. *Methods Enzymol* 1987, **144** : 115-139
- EYRE DR, DICKSON IR, VAN NESS KP. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J* 1988, **252** : 495-500
- GARNERO P, HAUSER E, CHAPUY MC, MARCELLI C, GRANDJEAN H, MULLER C, CORMIER C, BRÉART G, MEUNIER PJ, DELMAS PD. Can markers of bone turnover predict hip fractures in elderly women ? The EPIDOS study. *Am Society for Bone and Mineral Research Abstracts* 1995
- HANSEN M, OVERGAARD K, RIIS B, CHRISTIANSEN C. Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis : 12 year study. *Br Med J* 1991, **303** : 961-964
- HASSAGER C, FABBRI-MABELLI G, CHRISTIANSEN C. The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen. *Osteoporosis Int* 1993, **3** : 50-52
- JOHANSEN JS, RIIS BJ, DELMAS PD, CHRISTIANSEN C. Plasma BGP : an indicator of spontaneous bone loss and the effect of oestrogen treatment in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1988, **18** : 191-195
- JOHNSTON CC, MELTON LJ, LINDSAY R, EDDY DM. Clinical indications for bone mass measurements. *J Bone Miner Res* 1989, **4** : 1-29
- KIVIRIKKO KI. Excretion of urinary hydroxyproline peptide in the assessment of bone collagen deposition and resorption. In Frame B., Potts J.T. Jr (Eds) *Clinical disorders of Bone and Mineral Metabolism. Excerpta Medica*, Amsterdam, 1983, 105-107
- KRAEHLIN M, LAU KHW, LIANG L. Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, **71** : 442-451
- LOWRY M, HALL DE, BROSNAN JJ. Hydroxyproline metabolism by the rat kidney : Distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* 1985, **39** : 955
- LUFKIN EG, WAHNER HW, O'FALLON WM, HODGSON SF, KOTOWICZ MA, LANE AW, JUDD HL, CAPLAN RH, RIGGS LB. Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *J Clin Invest* 1992, **18** : 191-195
- MORO L, MUCELLI RSP, GAZZARINI C. Urinary bêta1-galactosyl-O-hydroxylysine (GH) as a marker of collagen turnover of bone. *Calcif Tissue Int* 1988a, **42** : 87-90
- MORO L, MODRICKY C, ROVIS L. Determination of galactosyl hydroxylysine in urine as a mean for the identification of osteoporotic women. *Bone Miner* 1988b, **3** : 271-276
- PARFITT AM, SIMON LS, VILLANUEVA AR. Procollagen type I carboxyterminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 1987, **2** : 427-436
- PIEDRA C, TORRES R, RAPADO A. Serum tartrate-resistant acid phosphatase and bone mineral content in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1989, **45** : 58-60
- PRICE PA, PARTHERMORE JG, DEFTOS LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 1980, **66** : 878-883
- PORS NIELSEN S, BARENHOLDT O, HERMANSEN F, MUNK-JENSEN N. Magnitude and pattern of skeletal response to long term continuous and cyclic sequential oestrogen/progestin treatment. *Br J Obstet Gynaecol* 1994, **101** : 319-324

- PRICE PA. Vitamine K-dependent bone proteins. In : Cohn D.V., Martin T.J., Meunier P.J. (eds), *Calium Regulation and Bone Metabolism. Basic and Clinical Aspects*, vol. 9, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1981, 419-426
- PROCKOP OJ, KIVIRIKKO KI. Hydroxyproline and the metabolism of collagen. In Gould B.S. (Ed.), *Treatise on Collagen*, vol. 2, Academic Press, New York, 1968, pp 215-246
- RIIS BJ, OVERGAARD K, CHRISTIANSEN C. Biochemical markers of bone turnover to monitor the bone response to postmenopausal hormone replacement therapy. *Osteoporosis Int* 1995, **5** : 276-280
- ROBINS SP, BLACK D, PATERSON CR, REID MD, DUNCAN A, SEIBEL MJ. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest* 1991, **21** : 310-315
- SMESROD B, MELKKO J, RISTELL L, RISTELL J. Circulating C-terminal propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 1990, **271** : 345-350
- SLEMENDA C, HUI SL, LONGCOPE C. Sex steroids and bone mass. A study of changes about the time of menopause. *J Clin Invest* 1987, **80** : 1261-1269
- STEPAN JJ, SILINKOVA-MALKOVA E, HAVRENEK T. Relationship of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta* 1983, **133** : 189-200
- STEPAN JJ, POSPICHAL J, PRESL J, PACOVSKY V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. *Bone* 1987, **8** : 279-284
- SZULC P, CHAPUY MC, MEUNIER PJ, DELMAS PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993, **91** : 1769-1774
- UEBELHART D, GINEYTS E, CHAPUY MC, DELMAS PD. Urinary excretion of pyridinium crosslinks : A new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 1990, **8** : 87-96
- UEBELHART D, SCHLEMMER A, JOHANSEN J, GINEYTS E, CHRISTIANSEN C, DELMAS PD. Effect of the menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium crosslinks. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, **72** : 367-373