

СЕРУМСКИ МАРКЕР ОСТЕОКАЛЦИН И ЗАРАСНУВАЊЕ НА ОРАЛНОХИРУРШКИ КОСКЕНИ ДЕФЕКТИ КАЈ ПАЦИЕНТИ СО DIABETES MELLITUS

Апостолова Гордана¹, Величковски Борис¹, Велеска-Стевковска Даниела¹, Алексова Павлина², Марковиќ -Темелкова Снежана³, Мечевска-Јовчевска Јасмина⁴

- 1 Универзитет “Св. Кирил и Методиј” – Скопје, Стоматолошки факултет, Катедра за орална хирургија
- 2 Универзитет “Св. Кирил и Методиј” – Скопје, Стоматолошки факултет, Катедра за болести на забите и ендодонтот
- 3 Универзитетска Клиника за ендокринологија, дијабетес и метаболички нарушувања, Клинички центар Скопје
- 4 Универзитетска Клиника за клиничка биохемија, Клинички центар Скопје

Автор за кореспонденција: Апостолова Гордана, goca.apostolova@gmail.com, 071 320 335

Апстракт

Коските се живо, динамично сврзно ткиво што обезбедува механичка поддршка на организмот и заштита, а функционира како систем на сложена метаболна и минерална хомеостаза. Коските доживотно се ремоделираат преку активен метаболен процес во кој учествуваат остеокластите и остеобластите. Негативното влијание на дијабетесот врз скелетниот систем е предмет на истражување во многу стручни и научни трудови чии број се зголемува соодветно на зголемувањето на бројот на пациентите заболени од дијабетес во светски рамки.

Целта на трудот беше да се одреди вредноста на серумскиот маркер остеокалцин (како директен индикатор за процесот на коскена апозиција) и неговото евентуално влијание врз процесот на минерализација проследен преку пораст на коскената густина на оралнохируршки дефекти кај пациенти со дијабетес.

Изработена е проспективна клиничка студија на 100 испитаници поделени во две групи, група испитаници со дијабетес (60) и контролна група испитаници кои немаат дијабетес (40). Кај сите испитаници беа проследени вредностите на серумскиот маркер остеокалцин, HbA1c како и % на зараснување на оралнохируршки дефект во однос на околната здрава коска во период од 12 месеци.

Вредностите на остеокалцин кај пациентите со дијабетес се значајно намалени и истите влијаат врз динамиката на минерализација проследена преку пораст на коскената густина на оралнохируршки дефекти.

Познавањето на серумските вредности на остеокалцин може да биде едноставен, но прецизен параметар за проценка на зараснување на коскени дефекти кај пациентите со дијабетес.

Клучни зборови: коскен метаболизам, остеокалцин, спонтано коскено зараснување

Вовед

Коските се живо, динамично сврзно ткиво што обезбедува механичка поддршка на организмот и заштита, а функционира како систем на сложена метаболна и минерална хомеостаза. Коските доживотно се ремоделираат преку активен метаболен процес во кој учествуваат остеоκластите и остеобластите^{1,2}.

Дијабетесот, како системско метаболно нарушување кое се карактеризира со хронична хипергликемија, предизвикува долгорочно оштетување, дисфункција и слабост на различни органи и системи³. Негативното влијание на дијабетесот врз скелетниот систем е предмет на истражување во многу стручни и научни трудови чии број се зголемува соодветно на зголемувањето на бројот на пациентите заболени од дијабетес во светски рамки.

Коскениот метаболизам кај дијабетес тип 1 е засегнат директно од недостатокот на инсулин или индиректно преку честите хронични компликации од дијабетесот прикажани во вид на микроваскуларни компликации^{4,5}.

Постојаната хипергликемија ја инхибира остеобластната диференцијација со продложување на коскената апопозиција и минерализација и кај пациентите со дијабетес тип 2. Инсулинската резистентност присутна кај овој вид на дијабетес може да ја намали количината на остеобластите и синтезата на коскениот матрикс⁶.

Балансот помеѓу коскената ресорпција и коскената формација може да се проследи преку циркулирачки протеини (биолошки маркери) во серум и урина со што добиваме клинички употребливи сознанија за постоечките нормални и патолошки процеси кои влијаат врз клеточната активност на коските⁷. Коскениите маркери се поделени во две подгрупи на формативни и ресорптивни маркери.

Остеокалциот (OC) е еден од најчесто анализираните формативни маркери, специфичен остеобластен неколаген протеин, квантитативно најзастапен протеин што го продуцираат остеобластите, а кој истовремено влијае на остеобластната функција^{8,9}. Ниските серумски вредности на остеокалцин влијаат за намалување на активноста на остеобластите^{10,11}.

Остеокалциот праќа сигнали до панкреасните β-клетки и масното ткиво, со што учествува во зголемување на инсулинската секреција и β-клеточната пролиферација и во регулирањето на количеството на масно ткиво. Нивоата на серумски остеокалцин негативно корелираат со нивоата на гликоза во крвта, изразени преку вредностите на гликозилиран хемоглобин (HbA1C), односно серумскиот остеокалцин е значајно повисок кај пациенти со HbA1C ≤ 7.5, споредено со пациентите чии HbA1C > 7.5^{10,12,13,14,15,16}.

Метаболните аспекти на дијабетесот како системско пореметување, директно влијаат врз процесот на зараснување на фрактури и дефекти во вилчните коски кои настануваат со остеотомија или како резултат на патолошки процес^{17,18,19}. Коскениот зараснување се одвива во три фази: инфламаторна фаза, фаза на репарација и фаза на ремоделирање. По завршување на ремоделирањето коската ја добива својата претходна градба, структура и механичка издржливост.

Времето потребно за зараснување на алвеоларните дефекти кои настануваат по орално-хируршка интервенција (екстракција на импактирани заби, апикотомија или цистектомја) е различно и зависи од бројни локални и општи фактори каде се вбројува и дијабетесот^{20,21,22}.

Хроничната хипергликемија кај пациентите со дијабетес доведува до микроангиопатија која има свое влијание, како врз мекото ткиво во оралната празнина така и врз коскениот ткиво^{23,24}. Кај пациентите со дијабетес се забележува намалена остеобластна функција (намалено количество на матрикс) како и промени во количината и квалитетот на колагените влакна кои го градат коскениот матрикс. Хистолошките анализи на Devlin¹⁸ извршени на дијабетични организми прикажуваат тенки и кратки колагени влакна, наспроти доволно долгите и дебели влакна кај здрави индивидуи. Оваа инхибиција во формирањето на колагениот коскен матрикс е проследена со намалено таложење на минерални соли што резултира со продолжено коскено зараснување.

Цел

Врз основа на изнесените литературни податоци ја поставивме и целта на овој труд:

- Да се одреди вредноста на серумскиот маркер остеокалцин (како директен индикатор за процесот на коскена апозиција) и неговото евентуално влијание врз процесот на минерализација проследен преку пораст на коскената густина на оралнохируршки дефекти кај пациенти со дијабетес.
- Да се одреди корелација помеѓу нивото на серумскиот маркер со видот на дијабетес, должината на траење и степенот на регулираност на дијабетесот.

Материјал и метод

За реализација на поставените цели беше изработена проспективна клиничка студија на Клиниката за орална хирургија при ЈЗУ Универзитетски Стоматолошки клинички центар во Скопје и на Катедрата за орална хирургија при Стоматолошкиот факултет во Скопје, во соработка со Универзитетска клиника за ендокринологија, дијабетес и метаболички нарушувања во Скопје.

Во истражувањето беа опфатени вкупно 100 испитаници, поделени во две групи, група испитаници со дијабетес (60) и контролна група испитаници кои немаат дијабетес (40). Кај сите пациенти со детална анамнеза, клинички преглед и рендгенолошка анализа беше утврдена индикација за орално-хируршка интервенција.

Секој пациент беше доброволно вклучен во истражувачкиот примерок што го потврди со потпис на изготвениот формулар за согласност.

За потребите на биохемиските анализи (HbA1C, остеокалцин) од секој пациент беше земена крв од кубиталната вена. Биохемиските анализи беа реализирани на Универзитетската клиника за клиничка биохемија во Скопје.

Оперативните интервенции беа извршени во хируршкиот блок на Клиниката за орална хирургија со строго почитување на зададениот оперативен протокол.

На контролата по 24 часа беше направена рендгенолошка верификација на настанатиот орално-хируршки дефект во вид на панорамска рендгенографија. Рендгенографиите беа повторени по 6 и 12 месеци од интервенцијата. Последователните рендгенографии беа дигитализирани преку фото скенер за професионална употреба, Epson perfection V 600 и анализирани преку апликацијата Adobe photoshop 7.0 за Windows

7 со употреба на Histogram на сива тонска скала со кој интензитетот на просветлување на мерената област се конвертира и изразува во пиксели.

Конвертирањето на областа од интерес во сива тонска скала овозможува точна проценка на зголемена или намалена коскена густина што е еквивалентно на степенот на минерализација на коскениот дефект.

Процентот беше пресметуван по формулата презентирана во анализите на Hren, Milijavec²⁵:

$$\text{Релативно зараснување} = \frac{\text{НК (густина на новоформирана коска)} \times 100}{\text{ОК (густина на околната коска)}}$$

Статистичката анализа е изработена во статистички програми STATISTICA 7.1 и SPSS 17.0.

Резултати и дискусија

Новите научни сознанија добиени во тек на изминатата декада укажуваат на клучната улога на скелетот во некои хомеостатски процеси вклучувајќи го и енергетскиот баланс. Новите сознанија најчесто се појаснуваат преку примерот на остеокалциот, маркер за коскена формација кој го продуцираат остеобластите, а кој воедно влијае на намалување на масното ткиво, ја промовира продукцијата на адипонектин, влијае на зголемување на бројот на бета клетките на панкреасот, ја зголемува инсулинската сензитивност и инсулинската секреција²⁶.

Остеокалциот го продуцираат остеобластите во тек на коскеноото формирање. Неговите молекули се инкорпорираат во коскениот матрикс каде учествуваат во процесот на минерализација. Мал дел од новосинтетизирираниот остеокалцин не се инкорпорира во матриксот и се излева во серумот каде претставува достапен, биохемиски мерлив параметар за степенот на коскена апозиција.

Резултатите добиени од анализата на нашиот истражувачки примерок покажуваат дека просечната вредност на остеокалциот (ОС) во контролната група изнесува 22.2 ± 5.1 мг/мл (минимум 11.34 мг/мл, максимум 28.7 мг/мл), додека во испитуваната група е пониска и изнесува 17.8 ± 4.4 мг/мл (минимум 6.42 мг/мл, максимум 25.3 мг/мл). (табела 1)

група	просек	број	Стд.Дев.	минимум	максимум
КГ	22.2	40	5.1	11.34	28.7
ИГ	17.8	60	4.4	6.42	25.3

Табела 1. Приказ на просечните вредности на серумскиот маркер за коскена формација - остеокалцин кај испитуваните групи

Разликата која се регистрира помеѓу вредностите на остеокалциноот е статистички сигнификантна за $p < 0.05$. (Табела 2)

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
OC	2473.500	2576.500	643.5000	-3.91552	0.000090

Табела 2. Приказ на Mann-Whitney U тест

Постојаната хипергликемија ја инхибира остеобластната диференцијација со продложување на коскената апозиција и минерализација кај пациентите со дијабетес тип 2. Инсулинската резистентност присутна кај овој вид на дијабетес може да ја намали количината на остеобластите и синтезата на коскениот матрикс^{6,27}. Нивоата на серумски остеокалцин негативно корелираат со нивоата на гликоза во крвта, а позитивно со инсулинската секреција и инсулинската чувствителност^{14,28}. Дека дијабетичарите имаат значително пониски концентрации на серумски остеокалцин, од тие кои немаат дијабетес прикажува и Lappin¹⁵ во чии студии остеокалциноот негативно корелира со процентот на гликозилиран хемоглобин во крвта исто како во истражувањата на Iglesias¹⁶.

Анализата на бројни студии укажува на фактот дека коскените пореметувања и кај дијабетес тип 1 може да произлегуваат од намалувањето на бројот на остеобластите^{21,29} со што е намален бројот на клетките одговорни за продукција на матрикс.

Сигнификантно намалените вредности на остеокалциноот укажуваат на намалено формирање на коскено ткиво кај испитаниците со дијагностициран дијабетес кои наоди се во согласност со наодите на Sun⁶, Hwang¹⁴ Lappin¹⁵ и Bao³⁰.

Во истражувањето беа опфатени и дополнителни параметри за корелација на добиените вредности на остеокалцин како видот на дијабетес, должината на траење и степенот на регулираност на дијабетесот,

Степенот на регулираност го одредуваат според вредностите на гликозилираниот хемоглобин-НbA1C. Гликозилираниот хемоглобин се формира во реакција помеѓу хемоглобинот и гликозата во крвта. Тој е директен показател на нивото на серумската гликоза за време од 2-3 месеци, колку што е полуживотот на хемоглобинот во циркулацијата. Заради тоа се нарекува и златен стандард во проценка на гликорегулацијата³.

Докажаното анаболно дејство на инсулиноот врз коскениот ткиво води кон очекување дека коскената деструкција ќе стагнира со оптимизирање на метаболната контрола, при што се добива негативната корелација на остеокалциноот со гликозилираниот хемоглобин-НbA1C. Бројни автори како Lappin¹⁵; Wang³¹; Karimifar¹³ и Jee-Aee³² прикажуваат значително повисоки вредности на серумскиот остеокалцин кај пациенти со $HbA1C \leq 7.5$, споредено со пациентите чии $HbA1C > 7.5$.

Во нашиот истражувачки примерок, степенот на добра гликемиска контрола го поставивме на 7,0% вредност на НbA1C согласно Петровски³³.

Во анализата на нашите испитаници од групата со дијабетес регистриравме статистички сигнификантна слаба негативна корелација помеѓу вредностите на **остеокалциноот** наспроти параметарот степен на гликемиска контрола изразен преку вредноста на НbA1C. (Табела 3)

ОС	Времетраење на дијабетесот	HbA1C
ИГ	$r=-0.1924$	$r=-0.3829$
	$p=0.141$	$p=0.003$

Табела 3. Приказ на корелацијата серумски маркер за коскена формација-Остеокалцин наспроти должина на траење на дијабетес и HbA1C

Времетраењето на дијабетесот во нашата студија не покажа статистички сигнификантна корелација со нивоата на серумскиот маркер остеокалцин (Табела 3).

Влијанието на времетраењето на дијабетесот врз остеогенезата и концентрациите на серумските маркери за коскен метаболизам во различни студии различно се толкуваат. Brandao et al.¹¹ не прикажуваат корелација помеѓу серумските коскени маркери и должината на траење на дијабетесот. Пациентите со кратко траење на дијабетесот (штотуку дијагностициран дијабетес) имаат засегната коскена формација заради отсуството на анаболниот ефект на инсулинот ако се работи за дијабетес тип 1. Доколку се работи за дијабетес тип 2, неговото долготрајно асимптоматско постоење во услови на хиперинсулинемија може да доведе до некоја од хроничните васкуларни компликации кои имаат свое влијание врз коскениот метаболизам. Затоа времетраењето на дијабетесот од моментот на неговото дијагностицирање не може да биде релевантен податок за состојбата на коскениот метаболизам прикажан преку анализа на серумските маркери^{34,35,36}.

Разликата во вредностите на ОС во нашето истражување помеѓу испитаниците со **различен тип на дијабетес** не покажа статистичка значајност (Табела 4).

Вид на ДМ/ ОС	просек	број	Стд.Дев	минимум	максимум
Дијабетес тип 2	17.7	31	4.8	6.42	25.3
Дијабетес тип 1	17.9	29	3.9	7.63	23.7

Табела 4. Приказ на просечните вредности на серумскиот маркер за коскена формација(ОС)кај различни видови на дијабетес (тип 1 и тип 2)

Просечната вредност на **ОС** во групата со дијабетес тип 2 изнесува 17.7 ± 4.8 нг/мл, а кај дијабетес тип 1 изнесува 17.9 ± 3.9 нг/мл. Разликата која се регистрира е статистички несигнификантна за $p > 0.05$ (Табела 5).

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
ОС	937.500	892.5000	441.5000	-0.118341	0.905797

Табела 5. Приказ на Mann-Whitney U тест

Во бројните анализирани литературни податоци доминира податокот за постоење на различни серумски вредности на циркулирачки инсулин помеѓу двете испитувани групи на дијабетес. Кај дијабетес тип 1 намаленото коскено формирање е предизвикано од

недостигот на инсулин или од присутната хронична хипергликемија^{5,37,38}. Анаболниот ефект на инсулинот врз коскениот ткиво, кој недостига во услови на хипоинсулинемија, предизвикува намалување на активноста на остеобластите кое клинички се манифестира како намалена коскена густина, а биохемиски како намалени вредности на остеокалцин. Кај пациенти со дијабетес тип 2 се забележуваат зголемени циркуирачки нивоа на инсулин кои не го остваруваат својот ефект заради постоечката резистентност на ткивата кон дејството на инсулинот. И во овие услови настанува хронична хипергликемија која може да го намали бројот на остеобластните клетки и да ја инхибира остеобластната диференцијација кои два елемента според Sun et al.⁶ се клучни, како во процесот на коскено зараснување така и во актуелниот процес на осеоинтеграција.

Различните механизми преку кои делуваат двете најголеми групи на дијабетес врз коскениот метаболизам не доведуваат до различни резултати во однос на серумските коскени маркери, но сепак треба да се внимава на различниот квалитет и квантитет на коскениот ткиво кое покажува промени во коскената структура и коскената густина^{39,40}.

Сите наведени биохемиски анализи за состојбата на коскениот и минерален метаболизам во двете групи на испитаници ги изработивме со цел да го докажеме нивното евентуално влијание врз процесот на зараснување на коскени дефекти во вилочните коски кои најчесто имаат јатрогена природа.

Просечната процентуална вредност на коскената густина на дефектот во однос на густината на околната здрава коска на имедијатната рендгенграфија во испитуваната група изнесува $29.7 \pm 5.1\%$, на контролната снимка по 6 месеци густината во однос на околната здрава коска се зголемува на $54.4 \pm 7.1\%$ и на контролата по 12 месеци ја достигнува вредноста од $77.2 \pm 8.7\%$ (Табела 6).

	група	просек	број	Стд.Дев	Минимум	максимум
Ртг имедијатно	ИГ	29.7	60	5.1	18.4	44.9
	КГ	23.8	40	5.2	17.4	36.0
Ртг по 6 месеци	ИГ	54.4	60	7.1	38.0	68.5
	КГ	52.5	40	7.3	35.2	69.1
Ртг по 12 месеци	ИГ	77.2	60	8.7	62.0	96.0
	КГ	84.5	40	9.0	65.8	97.8

Табела 6. Просечни радиографски анализи изразени во % на зараснување во однос на околната здрава коска кај двете испитувани групи

Просечната процентуална вредност на коскената густина на дефектот во однос на околната здрава коска на имедијатната рендгенграфија во контролната група изнесува $23.8 \pm 5.2\%$, на контролната снимка по 6 месеци зараснувањето во однос на околната

здрава коска се зголемува на $52.5 \pm 7.3\%$ и на контролата по 12 месеци ја достигнува вредноста од $84.5 \pm 9.0\%$ (Табела 6).

На контролната снимка по 12 месеци зараснувањето во однос на околната здрава коска во испитуваната група изнесува 77.2 ± 8.7 и е пониско од осификацијата во контролната група каде изнесуваше $84.5 \pm 9.0\%$. Разликата е статистички сигнификантна за $p < 0.05$ (Табела 7).

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
имедијатно	3732.500	1317.500	497.500	4.942773	0.000001
По 6 месеци	3267.500	1782.500	962.500	1.67104	0.0947
По 12 месеци	2500.500	2549.500	670.500	-3.72555	0.000195

Табела 7. Приказ на Mann-Whitney U тест

Виличните коски во услови на дијабетес покажуваат промени во метаболизмот идентични со промените кои настануваат и во другите коски (микроангиопатија, намалена остеобластна функција, промени во количината и квалитетот на колагените влакна кои го градат коскениот матрикс) што крајно резултира со продолжено коскено зараснување^{18,23,24}.

Бројни студии ги разработуваат серумските нивоа на остеокалцин и сите се согласни со фактот дека кај пациенти со дијабетес настануваат промени во неговите концентрации. Ние прикажавме сигнификантно намалени вредности на остеокалциноот во нашето истражување, што директно укажува на намалено формирање на коскено ткиво кај испитаниците со дијагностициран дијабетес⁴¹.

Резултатите ги потврдуваме со уште една статистичка метода – МРА (мултипна регресиона анализа). Со мултипната регресиона анализа кај пациентите кои имаат дијабетес е утврдена поврзаност помеѓу вредностите на осификацијата т.е. % на зараснување во однос на околната здрава коска (зависна-критериумска варијабла) и системот на предикторски варијабли од интерес- вид на дијабетес, времетраење на дијабетесот, степен на регулираност-HbA1C, ОС (независни варијабли).

Анализата на поединечните варијабли покажа значајно влијание на должината на траење на дијабетесот и вредностите на ОС врз процентот на коскено зараснување на дефектот.

За должина на траење на дијабетесот, коефициентот на парцијална регресиона анализа изнесува 0,323, а тестиран со t -тест покажува дека влијанието врз % на зараснување во однос на околната здрава коска е статистички значајно за $p = 0,013$ (Табела 8).

За ОС, коефициентот на парцијална регресиона анализа изнесува 0,324 а тестиран со t -тест покажува дека влијанието врз % на зараснување во однос на околната здрава коска е статистички значајно за $p = 0,012$ (Табела 8).

НЕЗАВИСНИ ВАРИЈАБЛИ	R = 0,749 R ² = 0,561 F = 4.539 p = 0,000063		
	Beta	t - test	p - level
пол	0.127266	1.12802	0.265162
возраст	0.047782	0.41075	0.683161
ВМИ	-0.154686	-1.29397	0.202136
Вид на дијабетес	-0.223339	-1.76261	0.084609
Должина на траење	-0.323594	-2.57356	0.013354*
HbA1C	-0.170630	-1.37227	0.176633
ОС	0.324102	2.61056	0.012161*

Табела 8. Мултипната регресиона анализа за % на зараснување во однос на околната здрава коска кај пациентите со дијабетес

Заклучок

Вредностите на формативниот серумскиот маркер остеокацин кај пациентите со дијабетес укажуваат на намалена активност на коскениот метаболизам.

Влијанието на вредностите на остеокацинот врз динамиката на минерализација, проследена преку пораст на коскената густина на оралнохируршки дефекти кај пациенти со дијабетес покажа статистичка значајност.

Видот на дијабетес, времетраењето и степенот на регулираност се фактори кои може да имаат свое влијание врз вредностите на остеокацинот. Анализата на резултатите покажа статистички сигнификантна негативна корелација помеѓу остеокацинот и степенот на регулираност на дијабетесот. Различните видови на дијабетес не влијаат врз висината на коскениот маркер остеокацин.

Добиените резултати укажуваат на фактот дека познавањето на серумските вредности на остеокацин може да биде едноставен но прецизен параметар за проценка на зараснување на коскени дефекти кај сите клинички дискутабилни пациенти со дијабетес.

Serum marker osteocalcin and bone healing of oral surgical defects in patients with diabetes mellitus

Apostolova Gordana¹, Velickovski Boris¹, Veleska-Stevkovska Daniela¹, Aleksova Pavlina², Markovic-Temelkova Snezana³, Mecevaska-Jovcevska Jasmina⁴

- 1** Department for oral surgery and implantology, Faculty of Dentistry “Ss. Cyril and Methodius University” – Skopje, Republic of Macedonia
- 2** Department for restorative dentistry and endodontics, Faculty of Dentistry “Ss. Cyril and Methodius University” – Skopje, Republic of Macedonia
- 3** University Clinic of endocrinology, diabetes and metabolic disorders, Clinical center Skopje, Republic of Macedonia
- 4** University Clinic of Clinical Biochemistry, Clinical center Skopje, Republic of Macedonia

Corresponding author: Apostolova Gordana, Mother Teresa 17, Skopje, 00389 71 320 335, goca.apostolova@gmail.com

Abstract

The bones are alive, dynamic connective tissue that provides mechanical support and body protection and works as a system of complex metabolic and mineral homeostasis. The bone remodeling is a lifelong active metabolic process involving osteoclasts and osteoblasts. Negative impact of diabetes on bone tissue is a subject of contemporary scientific research. The number of scientific articles increases with the increasing number of patients suffering from diabetes worldwide. The aim of the study was to determine the value of serum marker osteocalcin (as a direct indicator of the bone apposition process) and its possible influence on bone mineralization of oral surgical defects in patients with diabetes. Prospective clinical study was made including 100 subjects divided into two groups, patients with diabetes (60) and control group without diabetes (40). Serum values of osteocalcin, HbA1C and percent of relative bone healing in oral surgical defects were followed in all patients over a 12 months period. The serum values of osteocalcin in patients with diabetes are significantly lower which influenced on bone mineralization process followed by bone density increase in oral surgical defects. The awareness of serum values of osteocalcin may be a simple but accurate parameter for bone healing assessment in patients with diabetes.

Key words: bone metabolism, osteocalcin, spontaneous bone healing

Introduction

The bones are alive, dynamic connective tissue that provides mechanical support and body protection and works as a system of complex metabolic and mineral homeostasis. The bone remodeling is a lifelong active metabolic process involving osteoclasts and osteoblasts^{1,2}.

Diabetes mellitus is a systemic metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia which causes long-term damage, dysfunction and weakness of many organs and systems in the body³. The negative impact of diabetes on bone tissue is a subject of a contemporary scientific research. The number of scientific articles increases with the increasing number of patients suffering from diabetes worldwide. Bone metabolism in diabetes type 1 is directly affected by the insulin deficiency or indirectly through a common chronic complications of diabetes shown as microvascular complications^{4,5}.

Permanent hyperglycemia inhibits osteoblast differentiation with extended bone apposition and mineralization in patients with diabetes mellitus type 2. Insulin resistance present in this type of diabetes causes reduction of osteoblasts amount and synthesis of bone matrix⁶.

The balance between bone resorption and bone formation could be followed through a circulating proteins (biological markers) in serum and urine. Clinically usable information about normal and pathological processes of bone cells activity were obtained by using serum biomarkers⁷. Bone markers are divided into two subgroups of formative and resorptive markers.

Serum marker osteocalcin (OC) is one of the most analyzed formative bone markers. This specific osteoblast non-collagen protein is the most abundant protein produced by osteoblasts, which also affects osteoblast function^{8,9}. Low serum osteocalcin causes osteoblasts activity reduction^{10,11}.

Osteocalcin sends signals to pancreatic β -cells and fat tissue, which participate in insulin secretion and β -cell proliferation increase and also in regulation of adipose tissue amount. The serum osteocalcin levels have negative correlation with blood glucose levels, expressed through the values of glycated hemoglobin (HbA1C). Levels of serum osteocalcin were significantly higher in patients with HbA1C \leq 7.5, compared with patients whose HbA1C $>$ 7.5^{10,12,13,14,15,16}.

Metabolic aspects of diabetes as systemic disorder, directly affect the bone healing of fractures and defects in the jaw bone occurred by osteotomy or through a pathological process^{17,18,19}. Bone healing takes place in three phases: the inflammatory phase, the phase of repair and the bone remodeling phase. After remodeling phase the bone gets its previous building, structure and mechanical durability.

The time required for healing of alveolar bone defects (occurring after operative extraction of impacted teeth, apicotomy or cystectomy) is different and depends on numerous local and general factors including diabetes^{20,21,22}.

Chronic hyperglycemia in patients with diabetes leads to microangiopathy of oral soft and hard tissues^{23,24}. Diabetes causes reduction of osteoblastic function (reduced amount of

matrix) and quantitative/qualitative changes in the bone matrix collagen fibers. The histological analysis performed by Devlin¹⁸ shows thin and short collagen fibers in patients with diabetes versus long and thick fibers in healthy individuals. This inhibition of collagen formation is followed by reduced mineral salts resulting in extended bone healing.

Aim

Based on the presented literature we set the aim of this study:

- to determine the serum values of osteocalcin (as a direct indicator of bone apposition process) and its possible impact on bone mineralization followed by bone density increase in oral surgical defects in patients with diabetes
- To determine the correlation between serum markers representative with type of diabetes, duration of diabetes and diabetes regulation degree.

Matherial and method

Prospective clinical study was done at the Clinic for Oral Surgery, University Dental Clinical Center and the Department of Oral Surgery at the Faculty of Stomatology in cooperation with University Clinic of Endocrinology, diabetes and metabolic disorders in Skopje.

The survey included 100 respondents, divided into two groups, participants with diabetes (60) and control group without diabetes (40). For each patient detailed medical history, clinical examination and radiographic analysis was performed, leading to indication for oral surgery intervention.

Each patient was voluntarily involved in the research confirmed by a signature on a consent form prepared.

For biochemical analysis (HbA1C, osteocalcin) blood sample from antecubital vein was taken from each patient. Biochemical analyzes were conducted at the University Clinic for clinical biochemistry in Skopje.

Oral surgical interventions were performed in Clinic for Oral Surgery respecting the specified operative protocol.

After 24 hours x-ray radiography verification of oral surgical defect was made (panoramic radiography). Panoramic radiographs were repeated after 6 and 12 months. Subsequent radiographs were digitized through professional photo scanner, Epson perfection V 600 and analyzed by Adobe Photoshop 7.0 for Windows 7 using the gray scale histogram where illumination intensity of the measured field is converted and expressed in pixels (picture 4.12, b).

Converting the area of interest in gray scale enables accurate estimation of increased or decreased bone density which is equivalent to the degree of bone defect mineralization. The percentage was calculated using the formula presented in Hren, Milijavec²⁵ analysis:

$$\text{Relative bone healing} = \frac{\text{NB (new bone formation density)} \times 100}{\text{SB (surrounding bone density)}}$$

For the statistical analysis statistical programs STATISTICA 7.1 and SPSS 17.0 were used.

Results and discussion

New scientific insights gained over the past decade indicate the key role of the skeleton in some homeostatic processes including energy balance. The new findings usually explain through osteocalcin, bone formation marker produced by osteoblasts, which also affects adipose tissue reduction, promotes the adiponectin production, and increases the number of pancreatic beta cells, insulin sensitivity and insulin secretion²⁶.

The osteoblasts produce osteocalcin during bone formation process. Its molecules participate in the process of bone mineralization by incorporation in bone matrix. A small part of the newly synthesized osteocalcin is not incorporated into the matrix and transferred into serum which is accessible, measurable biochemical parameter of bone apposition degree.

The results obtained from this research analysis showed that the average value of osteocalcin (OC) in the control group(KG) was 22.2 ± 5.1 mg / ml (minimum 11.34mg / ml maximum 28.7mg / ml), while in experimental group(DG) was lower, at 17.8 ± 4.4 mg / ml (minimum 6.42mg / ml, maximum 25.3mg / ml) (Table 1).

group	average	Num.	St dev	min	max
DG	22.2	40	5.1	11.34	28.7
KG	17.8	60	4.4	6.42	25.3

Table 1. Average serum marker osteocalcin in both studied groups

The difference between the values of osteocalcin is statistically significant for $p < 0.05$. (Table 2)

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
OC	2473.500	2576.500	643.5000	-3.91552	0.000090

Table 2. Mann-Whitney U test

Hyperglycemia inhibits osteoblast differentiation with extension of bone apposition and mineralization in patients with diabetes type 2. Insulin resistance in this type of diabetes reduced the amount of osteoblasts and bone matrix synthesis^{6,27}. The serum osteocalcin levels correlated negatively with blood glucose levels, and positively with insulin secretion and insulin sensitivity (14.28). Lappin¹⁵ shows significantly lower concentrations of serum osteocalcin in patients with diabetes vs. patients without diabetes. In his studies osteocalcin correlated negatively with the percentage of glycated hemoglobin in the blood as well as in Iglesias¹⁶ research.

Analysis of numerous studies suggesting that bone disorders in diabetes type 1 may arise from decreased number of osteoblasts (21.29) which means decreased number of cells responsible for bone matrix production.

Significantly reduced values of osteocalcin indicate reduced bone formation in subjects with diabetes. Our findings are consistent with the findings of Sun⁶, Hwang¹⁴ Lappin¹⁵ и Bao³⁰.

Additional parameters for osteocalcin values correlation were included such as type of diabetes, duration of diabetes and diabetes regulation degree.

The diabetes regulation degree was determined by the values of glycosylated hemoglobin-HbA1C. Glycosylated hemoglobin is formed in a reaction between hemoglobin and glucose in the blood. It is a direct indication of the glucose serum levels for a period of 2-3 months, as the half-life of hemoglobin in blood circulation. Because it is called “golden standard” in glycoregulation assessment³.

Proven anabolic effect of insulin on bone tissue leads to expectation that the bone destruction will stagnate with optimization of metabolic control, which gives a negative correlation between glycosylated hemoglobin-HbA1C and osteocalcin. Numerous authors such as Lappin¹⁵; Wang³¹; Karimifar¹³ and Jee-Aee³² show significantly higher serum levels of osteocalcin in patients with HbA1C \leq 7.5, compared with patients with HbA1C $>$ 7.5.

In our research we set value of HbA1C at 7.0% as good glycemic control under research of Petrovski³³.

In patients with diabetes statistically significant negative correlation between the values of osteocalcin versus level of glycemic control (HbA1C) were measured (Table 3).

The duration of diabetes in our study showed insignificant correlation with serum marker osteocalcin (Table 3).

OC	duration of diabetes	HbA1C
DG	r=-0.1924	r=-0.3829
	p=0.141	p=0.003

Table 3. Correlation between serum marker osteocalcin versus duration of diabetes and HbA1C

Duration of diabetes in different studies shows variously interpreted influence on osteogenesis and concentrations of bone serum markers. Brandao et al.¹¹ did not show correlation between bone serum markers and duration of the diabetes. Patients with short duration of diabetes (recently diagnosed diabetes) have affected bone formation due to the absence of insulin anabolic effect (in case of diabetes type 1). In case of diabetes type 2, long asymptomatic existence of hyperinsulinemia may lead to chronic vascular complications that have an impact on bone metabolism. Therefore, the duration of diabetes (in time of his diagnosis) may not be a relevant indicator for bone metabolism condition screened through analysis of serum markers^{34,35,36}.

Diabetes / OC	average	number	St.dev	min	max
Diabetes type 2	17.7	31	4.8	6.42	25.3
Diabetes type 1	17.9	29	3.9	7.63	23.7

Table 4. Average serum marker osteocalcin in different types of diabetes

In this study values of OC between respondents with different types of diabetes did not show statistical significance (Table 4). The average value of OC in type 2 diabetes group was 17.7 ± 4.8 ng / ml, while in type 1 diabetes was 17.9 ± 3.9 ng / ml. The difference is statistically insignificant register to $p > 0.05$ (Table 5).

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
OC	937.500	892.5000	441.5000	-0.118341	0.905797

Table 5. Mann-Whitney U test

In numerous analyzed data different serum circulating insulin between both groups of diabetes was shown. In diabetes type 1 absence of insulin or persistent chronic hyperglycemia caused decreased bone formation^{5,37,38}. Anabolic effect of insulin on bone tissue, missing in terms of hipoinsulinemia, causes osteoblasts activity decrease which is clinically manifested as osteocalcin and bone density reduce.

In type 2 diabetes patients increased circulating levels of insulin was observed. Because of resistance of target tissues to insulin action it does not exercise its effect. In these conditions chronic hyperglycaemia occurs with decreased quantity of osteoblastic cells and inhibition of osteoblast differentiation. This two elements, according to Sun et al.⁶, play a key role in the processes of bone healing and oseeintegration.

Different type of diabetes affect bone metabolism by various mechanisms leading to different results in terms of serum bone markers, but we still need to keep attention on different quality and quantity of bone tissue that shows changes in the bone structure and bone density^{39,40}.

All listed biochemical analyzes for bone metabolism condition in all including respondents were prepared to prove their potential impact on bone healing of defects in the jaw bones.

The average percentages of bone density in the defect versus density of the surrounding healthy bone on immediate radiography in the experimental group is $29.7 \pm 5.1\%$, to radiographic control image after 6 months bone density increased to $54.4 \pm 7.1\%$ and on the control after 12 months reaches a value of $77.2 \pm 8.7\%$ (Table 6).

The average percentages of bone density in the defect versus surrounding healthy bone on immediate radiography in the control group is $23.8 \pm 5.2\%$, to radiographic control image after 6 months bone density increased to $52.5 \pm 7.3\%$ and on the control after 12 months reaches a value of $84.5 \pm 9.0\%$ (Table 6).

	group	average	number	St dev	min	max
RTG immediate	DG	29.7	60	5.1	18.4	44.9
	KG	23.8	40	5.2	17.4	36.0
RTG afer 6 months	DG	54.4	60	7.1	38.0	68.5
	KG	52.5	40	7.3	35.2	69.1
RTG afer 12 months	DG	77.2	60	8.7	62.0	96.0
	KG	84.5	40	9.0	65.8	97.8

Table 6. Average radiographic analysis (%) of bone healing compared to the surrounding healthy bone in both groups

The different bone healing between the groups after 12 months surrounding healthy bone in the test group (77.2 ± 8.7 versus $84.5 \pm 9.0\%$) is statistically significant for $p < 0.05$ (Table 7).

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level
immediate	3732.500	1317.500	497.500	4.942773	0.000001
After 6 months	3267.500	1782.500	962.500	1.67104	0.0947
After 12 months	2500.500	2549.500	670.500	-3.72555	0.000195

Table 7. Mann-Whitney U test

In patients with diabetes jaw bones show changes in bone metabolism identical to the changes in other bones (microangiopathy, reduced osteoblastic function, quantitative and qualitative changes of collagen fibers that build bone matrix) which ultimately results in prolonged bone healing^{18,23,24}.

Numerous studies of osteocalcin serum levels suggest changes in its concentration in patients with diabetes. We showed significantly reduced osteocalcin values in our research, which directly indicates reduced bone tissue formation in subjects with diabetes⁴¹.

We confirm the results with another statistical method - MPA (multiple regression analysis). Multiple regression analysis in patients with diabetes determined connection between the values of bone healing (%) compared to the surrounding healthy bone (dependent variable) and the system of independent variables (type of diabetes, duration of diabetes, the degree of regulation-HbA1C, OC).

The analysis of independent variables showed a significant impact of duration of diabetes and values of OC on the percentage of bone healing.

For duration of diabetes, the coefficient of partial regression analysis was 0.323 and tested with t-test shows that the impact on bone healing (%) compared to the surrounding healthy bone is statistically significant for $p = 0,013$ (Table 8).

For OC, the coefficient of partial regression analysis is 0.324 and tested with t-test shows that the impact on bone healing (%) compared to the surrounding healthy bone is statistically significant for $p = 0,012$ (Table 8).

INDEPENDENT VARIABLES	R = 0,749 R ² = 0,561 F = 4.539 p = 0,000063		
	Beta	t - test	p - level
gender	0.127266	1.12802	0.265162
age	0.047782	0.41075	0.683161
BMI	-0.154686	-1.29397	0.202136
Type of diabetes	-0.223339	-1.76261	0.084609
Duration of diabetes	-0.323594	-2.57356	0.013354*
HbA1C	-0.170630	-1.37227	0.176633
OC	0.324102	2.61056	0.012161*

Table 8. Multiple regression analysis (%) of bone healing compared to the surrounding healthy bone in patients with diabetes

Conclusion

The values of formative serum marker osteocalcin in diabetic patients suggest reduced activity of bone metabolism. The influence of osteocalcin values on bone density increase in oral surgical defects showed statistical significance in patients with diabetes. Type of diabetes, duration of diabetes and degree of regulation (HbA1C) may have an impact on osteocalcin values. The results showed a statistically significant negative correlation between osteocalcin and degree of diabetes regulation. Different types of diabetes do not affect the osteocalcin levels. The results suggest that knowledge of serum values of osteocalcin may be a simple but accurate parameter for jaw defects bone healing assessment in all patients with diabetes.

Литература / References

1. Raisz LG. Clinical practice. Screening for osteoporosis. *N Eng J Med.* 2005; 353: 164-71.
2. Mecevska JJ. Komparativna studija na biohemiskite markeri na kosken metabolizam kaj postmenopauzalni zenii so primarna osteoporoza: efekti od bifosfonatna terapija (doktorska disertacija) Skopje, Makedonija. Prirodno matematički fakultet. 2010; 11-3.
3. Milenkovic T. Edukacija za tretman na lugeto so dijabetes, Skopje. *Jugoreklam.* 2005; 23-4.
4. Stolzing et al. Diabetes induced changes in rat Mesenchymal stem cells. *Cells tiss org.* 2010; 191(6): 453-65.
5. [Abbassy MA](#) et al. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(4): 364-9.
6. Sun DC et al. In vitro culture and characterization of alveolar bone osteoblasts isolated from type 2 diabetics. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45(6): 502-9.
7. Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Clev Clin J Med.* 2008; 75(10): 739-50
8. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Review Osteoporosis in patients with diadetes mellitus. *J Bone Mineral Res.* 2007; 22:1311-328.
9. Bouillon R. et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(4): 1194 -202.
10. Campos et al. Intensive insulin therapy and bone mineral density in type1 diabetes mellitus *Osteoporos Int.* 2000; 11: 455-9.
11. Brandao F et al. Bone metabolism is linked to disease duration and metabolic control in type1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 78: 334-9.
12. Blasiak M, Kuska J, Kokot F, Irzyniec T. Selected indicators of calcium-phosphate metabolism in patients with diabetes mellitus. *Endocrinol Pol.* 1989; 40: 251-62.
13. [Karimifar M](#) et al. Evaluation of bone loss in diabetic postmenopausal women. *J Res Med Sci.* 2012; 17(11): 1033-8.
14. Hwang YC, Jee JH, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Lee MK. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. *Diabetes Care.* 2012; 35(9): 1919-24.
15. [Lappin DF](#), [Eapen B](#), [Robertson D](#), [Young J](#), [Hodge PJ](#). Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *Clin Periodontol.* 2009; 36(8): 634-41.
16. [Iglesias P](#) et al. Serum concentrations of osteocalcin, procollagen type 1 N-terminal propeptide and beta-CrossLaps in obese subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; 75(2): 184-8.
17. Cifuentes M, Johnson MA, Lewis RD. Bone turnover and body weight relationship differ in normal-weight compared with heavier postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* 2003; 14(2): 116-22.
18. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54(9): 1087-91.
19. Dominiak M, Lysiak-Drwal K, Zietek M, Gerber H. Efficacy of healing process of bone defects after apectomy: results after 6 and 12 months. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(8): 51-5.

20. Sakai D, Okazaki J, Komasa Y. Bone healing of tooth extraction socket in type 2 diabetes. *J Oral tissue Engin.* 2008; 5(3): 134-44.
21. Thrailkill KM et al. Bone formation is impaired in a model of type1 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2005; 54: 2875-81.
22. Sato D. Socket healing after rat mandibular incisor extraction. *J Stomatol Soc Jpn.* 2005; 72: 98-105.
23. Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Impl Res.* 2010; 21:673–81.
24. Ferron M et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell.* 2010; 142(2): 296–308.
25. Ihan Hren N, Miljavec M. Spontaneous bone healing of the large bone defects in the mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(12): 1111-6.
26. Ruzicska E, Poór G. Diabetes and bone metabolism. *Orv Hetil.* 2011; 152(29): 1156-60.
27. Duarte VM et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23(1): 58-68.
28. Okazaki R et al. Metabolic Improvement of Poorly Controlled Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus Decreases Bone Turnover. *JCE&M.* 1997; 82(9): 2915-20.
29. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289(5484): 1501-4.
30. Bao YQ et al. Relationship between serum osteocalcin and glycaemic variability in Type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011; 38(1): 50-4.
31. Wang Q et al. The Relationship between Serum Osteocalcin Concentration and Glucose Metabolism in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol.* 2013, Article ID 842598, doi:10.1155/2013/842598.
32. Jee-Aee I et al. Relationship between osteocalcin and glucose metabolism. *Clin Chim Acta.* 2008; 396(1-2):66-9.
33. Petrovski G. Se sto treba da znaete za insulinskata pumpa. *Univerzitetska klinika za endokrinologija, dijabetes I metabolički narusovanja, Skopje.* 2011; 13-7.
34. Blackwell P, Godber IM, Lawson N. Biochemical Markers of Bone Turnover. *Clin Trials Osteopor.* 2007; 4: 247-69.
35. Saleem U, Mosley TH, Kullo IJ. Serum Osteocalcin Is Associated With Measures of Insulin Resistance, Adipokine Levels, and the Presence of Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(7):1474–8.
36. Asrar-el A. Serum osteocalcin, Zinc nutritive status and bone turnover in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Metab.* 2011; 2(4): 128-32.
37. Vestergaard P. Diabetes and bone. *J Diabetes Metab.* 2011; 88(3): 238-45.
38. Verhaeghe J. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes.* 1990; 39(4): 477-82.
39. Linde JS. Diabetes, Biochemical Markers of Bone Turnover, Diabetes Control, and Bone. *Front Endocrinol.* 2013; 21(4): 1-17.
40. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective. *Int J Lower Extr Wounds.* 2011; 10(1): 16-32.
41. Brandi ML. Bone health and diabetes. *Medicographia.* 2010; 32(4): 364-9.