

Snežana Marić Krejović*, Danijela Marković Knežević**,
Božidar Petrović***, Ana Dević****, Sreten Knežević*****

UTICAJ ANTIRESORPTIVNE TERAPIJE NA MARKERE METABOLIČKE AKTIVNOSTI KOSTI KOD ŽENA U POSTMENOPAUIZU

Sažetak: *Uvod:* Osteoporozu, sistemsko oboljenje kostiju, predstavlja ozbiljan zdravstveni i socijalno-ekonomski problem zbog svojih posledica, preloma kostiju. Smatra se da 10% svetske populacije boluje od osteoporoze, a posebno su ugrožene žene u postmenopauzi.

Metode: Istraživanje je sprovedeno u grupi od 80 žena sa osteopenijom u postmenopauzi tretiranih antiresorptivnim terapijskim protokolom. Kontrolnu grupu činilo je 40 žena u postmenopauzi koje nisu uzimale nikakvu terapiju. Od parametara metaboličke aktivnosti kosti korišćen je osteokalcin kao parametar formiranja kosti. Krv je vađena pre uvođenja terapije i 3 meseca nakon uvođenja terapije. Prosečna vrednost osteokalcina tri meseca nakon terapije tibolonom i HRT bila je niža u odnosu na prosečnu vrednost osteokalcina pre terapije.

Rezultati: Tokom primene tibolona i HRT serumske koncentracije osteokalcina bile su statistički značajno niže u odnosu na one pre terapije. Naši rezultati pokazali su izrazitu efikasnost tibolona i HRT na koštanoj resorpciji i supresivni efekat na koštano formiranje, što proističe iz vezanosti između formiranja i resorpcije kosti.

Zaključak: Praćenje parametara metaboličke aktivnosti kosti veoma je korisno dijagnostičko sredstvo u proceni efekta tibolona na metaboličku aktivnost kosti i eventualno u prognozi konačnog ishoda na koštanoj masi.

Ključne reči: Osteoporozu, postmenopauza, tibolon, HRT.

* Zdravstveni centar Užice – Dom zdravlja Užice; e-mail: snezana.krejovic@gmail.com. Deo teksta koji objavljujemo je iz doktorske disertacije Snežane Marović Krejović odbranjene na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu.

** Zdravstveni centar Užice – Dom zdravlja Užice

*** Zdravstveni centar Užice – Dom zdravlja Užice

**** Klinički centar Zemun – Ginekološko-akušersko odeljenje

***** Zdravstveni centar Užice – Radiološka služba

Uvod

Osteoporozna je generalizovano oboljenje kostiju koje se karakteriše poremećenom čvrstinom kosti usled čega raste predispozicija za frakture. Koštana čvrstina podrazumeva kvantitet (koštana masa-gustina, veličina kosti) i kvalitet kosti (mikroarhitektura, mineralizacija matriksa, koštani metabolizam, nakupljena mikroskopska oštećenja, oštećenja trabekula i korteksa) [1]. Posledica ovih poremećaja su frakture, najčešće na dorzalnoj kičmi, kuku i distalnom delu podlaktice. Rizik za pojavu frakture kičme kod žene je 20%, za frakturu kuka 18% i za frakturu distalnog dela podlaktice 15% [2]. Nije zanemarljiv ni mortalitet, naročito kod preloma kuka, jer približno 20% bolesnika starijih od 50 godina umire u prvoj godini posle nastanka preloma [3].

Rana dijagnoza osteoporoze moguća je jedino merenjem koštane gustine (BMD–Bone Mineral Density), a preporučeni metod se bazira na primeni niskoenergetskog X zračenja (dvostruko energetska X zračna apsorpciometrija – DXA), koji meri koštanu gustinu na telima kičmenih pršljenova i vratu femura. Normalan nalaz predstavlja koštana gustina koja nije više od 1 standardne devijacije (SD) manja u odnosu na srednju vrednost maksimalne koštane mase u mlade, zdrave žene između 20 i 30 godina (T skor).

Osteopenija označava izmerenu koštanu gustinu koja je 1–2,5 SD (10–25%) manja od maksimalne koštane mase u mlade, zdrave žene između 20 i 30 godina (T skor).

Osteoporozna označava koštanu gustinu koja je više od 2,5 SD (25%) manja od maksimalne koštane mase u mlade, zdrave žene.

Lekovi za prevenciju i lečenje osteoporoze prema mehanizmu dejstva dele se u dve grupe:

1. antiresorptivni lekovi (hormonska supstitucionna terapija – HRT, bisfosfonati, selektivni modulatori receptora za estradiol, kalcitonin, sintetski steroidi sa estrogenim efektom), koji imaju za cilj da spreče dalji gubitak koštane mase.
2. anabolički lekovi (lekovi na bazi paratireoidnog hormona), koji imaju za cilj da pospeše izgradnju koštanog matriksa, odnosno stimulišu anabolizam u kostima.

Koštani biomarkeri ili markeri koštanih promena jesu indikatori metabolizma kostiju koji potiču iz koštane matrice ili koštanih ćelija. U postavljanju dijagnoze osteoporoze, pored anamneze, procene faktora rizika, kliničkog pregleda i određenih laboratorijskih analiza, najznačajnije je određivanje mase, odnosno gustine kosti i procena metaboličke aktivnosti kosti (turnover) [4]. Informacije o dinamičkom stanju metabolizma kostiju mogle bi ranije ukazati na neke patološke promene u

kostima, odnosno na rizik nastanka nekih bolesti lokomotornog aparata. Merenjem koncentracije koštanih markera moguće je dobiti bržu informaciju o terapijskom odgovoru u odnosu na merenje koštane gustine. Značajne promene vrednosti koštanih markera mogu se otkriti brzo, tri meseca nakon uvođenja terapije, dok se promena koštane gustine može proceniti tek nakon jedne godine nakon uvođenja terapije [5,6].

Biohemijski markeri metaboličke aktivnosti kosti jesu molekuli koji se oslobađaju pri izgradnji ili razgradnji kostiju ili su enzimi aktivnih osteoblasta. Biohemijski markeri kosti mogu se podeliti u dve grupe:

1. biohemijski markeri formiranja kosti (ukupna ili koštano-specifična alkalna fosfataza, osteokalcin, karboksi-terminalni propeptid kolagena tip I, - amino-terminalni propeptid kolagena tip I);
2. biohemijski markeri resorpcije kosti (acidna fosfataza otporna na tartarat, slobodan piridinolin i deokspiridinolin, N- ili C-terminalni telopeptid tipa I kolagena (CTX I NTX I)).

Od biohemijskih markera turnovera kosti u radu je korišćen osteokalcin. Osteokalcin je marker koštanih promena koji kao koštano-specifični protein vezuje kalcijum i oslobađa se tokom formiranja i resorpcije kostiju. Osteokalcin je mali peptid od 49 amino-kiselina i zove se još koštani GLA (Glutamic acid–Gla) protein jer sadrži tri ostatka γ -karboksilglutaminske kiseline. Ovi ostaci glutaminske kiseline su karboksilirani u gama poziciji njenih ostataka translatorno, dejstvom vitamina K. Osteokalcin primarno sintetišu osteoblasti, odontoblasti i hipertrofični hondrociti. Posle sinteze otpušta se i ugrađuje u ekstracelularni matriks (>80%). Jedan deo (10–30%) novosintetizovanog osteokalcina otpušta se u cirkulaciju, gde se njegova koncentracija može meriti imunohemijskim metodama [7].

Nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS, USA, www.nccls.org) objavio je 2004. godine smernice za upotrebu koštanih biomarkera.

Preporuke za korišćenje koštanih biomarkera:

- u identifikaciji osoba sa pojačanim metabolizmom kostiju,
- u predviđanju rizika od preloma kostiju kod žena posle menopause,
- u proceni reakcije na lečenje pacijenata sa osteoporozom ili rizika osteoporoze kada tretman može da se sprovodi antiresorptivnim ili anaboličkim agensima.

Cilj istraživanja je da se utvrdi da li tibolon i HRT utiču na parametre metaboličke aktivnosti kosti kod žena u postmenopauzi sa smanjenom koštanom gustinom.

Materijal i metode

U ovoj prospektivnoj, kontrolisanoj kliničkoj studiji učestvovalo je 120 pacijentkinja u postmenopauzi sa smanjenom koštanom gustinom (osteopenijom), koje su bile tretirane tibolonom i hormonskom supstitucionom terapijom. Pored ove grupe, u studiji je učestvovalo i 40 pacijentkinja (kontrolna grupa) koje su bile u postmenopauzi sa smanjenom koštanom gustinom (osteopenijom) i koje nisu tretirane nikakvom terapijom.

- I grupa (40) – pacijentkinje tretirane sintetskim steroidom sa estrogenim efektom (tibolon 2,5 mg), jedna tableta dnevno,
- II grupa (40) – pacijentkinje tretirane HRT (2 mg estradiol + 1 mg noretisteron acetat), jedna tableta dnevno,
- III grupa – kontrolna grupa (40) – pacijentkinje u postmenopauzi sa normalnom koštanom gustinom.

Kriterijumi za uključivanje pacijentkinja u istraživanje su:

1. Prirodna ili hirurška (histerektomija) postmenopauza (godinu dana nakon poslednjeg menstrualnog krvarenja do pet godina nakon menopauze).
2. Niska koštana gustina ($T < -1$) potvrđena nalazom osteodenzitometrije (DXA).

Uzorke venske krvi za određivanje koštanog markera uzimali smo ujutru (od 7–8 h) nakon noćnog uzdržavanja od jela i pre uvođenja terapije. S obzirom na to da se koštanim markerima može veoma brzo dobiti informacija o uspehu terapije, nakon tri meseca od uvođenja terapije svim pacijentkinjama ponovili smo vrednost serumskog koštanog markera.

Rezultati

Svim pacijentkinjama određivan je osteokalcin pre i tri meseca posle terapije. Deskriptivna statistika osteokalцина pre terapije po grupama i kod svih pacijentkinja zajedno prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Osteokalcin pre terapije

GRUPA	N	Aritmetička sredina	Minimum	Maksimum	SD
<i>Tibolon</i>	40	29.66	20	39	3.343
<i>HRT</i>	40	29.91	21	37	3.257
<i>kontrolna</i>	40	17.84	11	23	4.003
<i>Ukupno</i>	120	26.86	11	39	6.175

Iz tabele se vidi da je prosečna vrednost osteokalcina pre terapije kod pacijentkinja na terapiji tibolonom i HRT vrlo približna, dok kontrolna grupa ima daleko nižu prosečnu vrednost osteokalcina od ostalih grupa. Analizirajući ove podatke ANOVA testom, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupa po prosečnoj vrednosti osteokalcina pre terapije ($\Phi=131.436$; $p=0.000$).

Naknadnim testiranjem, Bonferroni testom, utvrđeno je da je razlika jedino statistički značajna između kontrolne i ostalih grupa.

Zatim je analiziran osteokalcin 3 meseca posle terapije; deskriptivna statistika osteokalcina po grupama, kao i svih pacijentkinja zajedno prikazana je u tabeli 2.

Tabela 2. Osteokalcin 3 meseca nakon terapije

GRUPA	N	Aritmetička sredina	Minimum	Maksimum	SD
<i>Tibolon</i>	40	26.32	21	31	3.312
<i>HRT</i>	40	27.63	20	35	3.193
<i>kontrolna</i>	40	18.98	12	24	3.495
<i>Ukupno</i>	120	25.25	12	35	4.821

Iz tabele se vidi da obe grupe osim kontrolne imaju slične vrednosti osteokalcina i kreću se oko 27 ng/mL, dok je vrednost osteokalcina kod kontrolne grupe u proseku daleko manja nego kod ostale dve grupe. Analizirajući ove podatke ANOVA testom, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ove tri grupe po prosečnoj vrednosti osteokalcina 3 meseca nakon terapije ($\Phi=73.550$; $p=0.000$).

Naknadnim testiranjem, Bonferroni testom, utvrđeno je da je razlika jedino statistički značajna između kontrolne i ostalih grupa. Sve razlike su visokostatistički značajne.

Zatim je analiziran uticaj grupne pripadnosti na promenu osteokalcina u vremenu. Zapravo, statističkim testom testirano je da li različita terapija ima efekta na promenu vrednosti osteokalcina nakon tri meseca od uvođenja terapije.

Za ovu analizu korišćena je faktorska ANOVA ponovljenih merenja. Rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. ANOVA ponovljenih merenja za osteokalcin

Greenhouse-Geisser

	Φ	p=	Eta^2
<i>osteokalcin</i>	50.679	.000	.323
<i>osteokalcin * grupa</i>	15.184	.000	.301

Na osnovu rezultata ANOVA testa utvrđeno je da postoji visokostatistički značajna razlika u prosečnoj vrednosti osteokalcina pre i posle terapije kod svih pacijenata zajedno i da je ta razlika kvantitativno mala, ali nije zanemarljiva. Takođe, utvrđeno je da postoji visokostatistički značajan uticaj vrste terapije (grupa) na promenu vrednosti osteokalcina i taj efekat je takođe kvantitativno slab, ali nije zanemarljiv.

Daljom analizom ispitivana je promena osteokalcina u okviru svake od grupa. Rezultati naknadnih testiranja prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Naknadna testiranja promene osteokalcina u vremenu u odnosu na grupe

GRUPA	Prosečna razlika pre-posle	SE	p=	95% IP za razliku	
				Donja granica	Gornja granica
<i>Tibolon</i>	3.34(*)	.455	.000	2.494	4.299
<i>HRT</i>	2.30(*)	.455	.000	1.469	3.274
<i>kontrolna</i>	-1.14(*)	.558	.023	-2.391	-.181

Iz tabele se vidi da su sve razlike statistički značajne, pri čemu je najveća razlika u prosečnoj vrednosti osteokalcina u grupi pacijentkinja koji su bili na tibolon terapiji, dok je najmanja promena u kontrolnoj grupi pacijenata.

Diskusija

U radu su prikazani obrađeni rezultati kliničke primene tibolona i HRT u tretmanu žena sa osteopenijom u postmenopauzi. Za procenu terapijskog efekta korišćeno je određivanje parametra metaboličke aktivnosti kosti koji pokazuje stepen formiranja kosti (osteokalcin). Od ključnog interesa za naše istraživanje bilo je praćenje ovog parametra tokom terapije i upoređivanje dobijenih rezultata sa preterapijskim nivoom. Naši rezultati pokazali su izrazitu efikasnost tibolona i HRT na koštanu resorpciju, što je visoko, statistički signifikantno. Ovaj efekat prema našim rezultatima uočljiv je već nakon 3 meseca od uvođenja terapije. Ova činjenica je za kliničare veoma značajna jer praćenjem ovog metaboličkog parametra veoma brzo se može prognozirati željeni konačan terapijski efekat u smislu povećanja koštane mase.

U rezultatima, vrednosti kontrolne grupe prikazani su iz razloga što su i njima rađeni ovi markeri, ali pošto se sami markeri isključivo koriste kao pokazatelji efekta terapije, onda je ova grupa prikazana samo radi poređenja sa ostalim grupama.

Prosečna vrednost osteokalcina u našoj studiji bila je najmanja u kontrolnoj grupi, dok su ostale grupe ispitanika imale gotovo identične prosečne vrednosti. ANOVA testom je utvrđeno da je razlika u prosečnim vrednostima statistički značajna, ali naknadnim testiranjem utvrđeno je da je razlika jedino značajna između kontrolne i ostalih grupa.

Analizirajući prosečne vrednosti osteokalcina nakon 3 meseca od uvođenja terapije, utvrđeno je da su prosečne vrednosti ovog koštanog markera vrlo slične u ispitivanim grupama, osim u kontrolnoj grupi, gde je prosečna vrednost drastično manja u odnosu na ostale grupe. Analizom varijanse utvrđeno je da postoji značajna razlika, ali da se ta razlika isključivo odnosi na kontrolnu i ostale grupe. S obzirom na to da je ranije navedeno da kontrolna grupa služi čisto radi poređenja, možemo da zaključimo da se nakon tri meseca osteokalcin nije značajno razlikovao po grupama, kao i kada je u pitanju osteokalcin na početku terapije. Međutim, ono što je od interesa za ovu studiju predstavlja kolika je bila promena osteokalcina unutar svake grupe. Prethodnom analizom pokazali smo da su prosečne vrednosti osteokalcina pre i posle terapije približne u okviru svake grupe, ali ključno pitanje jeste da li je bilo promena osteokalcina unutar svake grupe, da li je pozitivna ili negativna i da li je statistički značajna. Analizom varijanse ponovljenih merenja utvrđeno je da postoji statistički visoko značajan uticaj terapijske procedure na promenu osteokalcina. Kada se analiziraju prosečne razlike osteokalcina u okviru svake grupe, utvrđeno je da je najveća razlika u grupi pacijentkinja koje su primale tibolon, a zatim u grupi pacijentkinja koje su bile na HRT. Promena prosečne vrednosti osteokalcina u kontrolnoj grupi nije od interesa i služi kao poredbena grupa.

Mnoge studije ukazuju da ukoliko je terapija imala efekta, očekivan je pad osteokalcina. Studija Fenkci V i saradnika [8], koja se bavila praćenjem efekta tibolona na postmenopauzalne žene, ukazuje da tromesečna terapija ovim lekom smanjuje koncentraciju serumskog osteokalcina za 50%. Naravno, u pitanju su žene koje nemaju osteoporozu, pa je i efekat terapije značajno veći u ovako kratkom vremenskom intervalu. Studija Rymer J i saradnika [9] uključila je 110 žena u ranom postmenopauzalnom periodu (od 6 do 36 meseci od poslednje menstruacije) koje su praćene 8 godina i kojima je utvrđeno da nemaju osteoporozu niti osteopeniju. Praćene su dve grupe žena, žene koje su primale Tibolon i kontrolna grupa žena (bez terapije). U osmogodišnjem praćenju utvrđeno je da su prosečne vrednosti osteokalcina varirale, ali i da nije bilo velikih varijacija. Ipak, vrednosti osteokalcina bile su manje u grupi ispitanica koje su primale tibolon nego u kontrolnoj grupi žena. Razlog tome je i mala promena BMD kod žena koje su bile na tibolon terapiji, dok je kontrolna grupa žena beležila stalni pad BMD-a. Iz rezultata ove studije možemo da zaključimo da je terapija tibolonom delotvorna i kada su u pitanju zdrave žene, odnosno ima protektivni efekat na kost. Do istog zaključka došli su i Gambacciani M i saradnici [10], koji ukazuju da se tibolonom smanjuje prosečna vrednost osteokalcina i kod zdravih žena u postmenopauzalnom periodu. Studija Ederven AG i Klosterboer HJ [11] na ekserimentalnim životinjama pokazala je da su ovariektomisani pacovi koji su pri-

mali tibolon imali daleko bolji BMD od kontrolne grupe životinja, kao i to da je pad osteokalcina bio veći u grupi životinja koje su primale tibolon. Još jedna od studija koja se bavi efektom tibolona na žene u ranoj postmenopauzi [12] ukazuje da, pored protektivnog efekta ovog leka na kosti, ovaj lek ima i povoljan efekat na neke od faktora kardiovaskularnog rizika, kao što su lipidi u krvi. Naime, ovaj efekat se ogleda u padu vrednosti ukupnog holesterola, triglicerida i Lp(a) kod žena u postmenopauzalnom periodu, tako da, pored efekta na kosti, ovaj lek ima i pozitivan efekat na kardiovaskularni sistem. Studija Delmas PD i saradnika [13], koja se bavi praćenjem postmenopauzalnih osteopeničnih žena, ukazuje da se u 12. nedelji od uvođenja terapije osteokalcin značajno smanjio i to za 17.8%. U našoj studiji pad osteokalcina u 12. nedelji iznosi 11.3%, ali razlog je i to što je stanje kostiju bilo lošije u našoj studiji nego u studiji Delmas i saradnika. Rezultati našeg istraživanja po pitanju efekta tibolona na osteokalcin poklapaju se sa rezultatima drugih istraživača, a to je da postoji pozitivan efekat tibolona, koštani metabolizam, kod žena sa osteopenijom u postmenopauzalnom periodu.

Mnoge studije ukazuju na pozitivan efekat HRT na koštani metabolizam. Praćenje koštanog "turn-over" markera kroz vreme najbolje pokazuje u kom pravcu ide koštani metabolizam pri određenoj terapiji. Studija Tuppurainen M i saradnika [14], koja prati žene sa osteoporozom pet godina, ukazuje da se klogestom osteokalcin kod osteoporotičnih žena u menopauzi smanjuje za 55%, dok kombinacija klogesta i klodronata smanjuje osteokalcin u proseku za 70%. Sam klodronat ima efekat sličan klogestu i snižava osteokalcin za 54%. Budući da je naša studija daleko kraće trajala, ne možemo očekivati ovoliki pad osteokalcina, ali iz naših rezultata jasno se vidi da postoji značajan pad ovog koštanog markera kroz tri meseca. Studija Arrenbrecht S i saradnika [15], koja prati nehisterektomisane postmenopauzalne žene, ukazuje da pacijentkinje koje su bile na HRT imaju daleko veći pad prosečnih vrednosti osteokalcina u prvoj godini praćenja nego pacijentkinje koje su primale placebo. Studija Albrecht W.E. i saradnika [16] takođe potvrđuje pozitivan efekat HRT na koštani metabolizam i još otvara novo pitanje, a to je da li treba konvencionalnu HRT zameniti dugociklusnim HRT. Warming L i saradnici [17] ispitivali su uticaj hormonske terapije na koštanu gustinu i metabolizam kod žena u postmenopauzalnom periodu i sa dijagnostifikovanom osteopenijom. Rezultati ove studije ukazuju da kod žena u postmenopauzalnom periodu sa osteoporozom HRT ima veoma pozitivan efekat na koštani metabolizam i samu koštanu gustinu. Naime, postoji značajna razlika u padu prosečnih vrednosti osteokalcina i ostalih koštanih markera u grupi pacijentkinja koje su bile na HRT u odnosu na placebo, gde vrednosti osteokalcina čak beleže i blag porast. Upoređujući ove rezultate sa našom studijom, kontrolna grupa je takođe beležila blag porast prosečnih vrednosti osteokalcina, dok je grupa pacijentkinja na HRT imala pad osteokalcina za tri meseca.

Zaključak

Tibolon i HRT kao predstavnici antiresorptivne terapije izrazito smanjuju nivo koštane resorpcije kod pacijentkinja u postmenopauzi sa osteopenijom. Ovakav efekat tibolona i HRT može se smatrati povoljnim metaboličkim miljeom za povećanje mase kosti i time smanjivanje frakturnog rizika. Efekat tibolona i HRT na koštani metabolizam uočljiv je već za 3 meseca nakon uvođenja terapije. Praćenjem parametara metaboličke aktivnosti kosti veoma je korisno dijagnostičko sredstvo u proceni efekta antiresorptivne terapije na metaboličku aktivnost kosti i eventualno u prognozi konačnog ishoda na koštanu masu.

Literatura:

- Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. NIH consensus statement 2000, 17:9.
- Grady D, Rubin S, Petitti D, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992; 117:1016-37.
- Reginster JY. The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health. *Curr Med Res Opin* 2005, 21(4):579-86.
- Kovačev B. Metaboličke bolesti kosti. Savremena administracija, Beograd, 1996, 111-21.
- Engler H., Koeberle D., Thuellmann B., Senn HJ., Riesen WF. Diagnostic and prognostic value of biochemical markers in malignant bone disease: A prospective study on the effect of biphosphonate on pain intensity and progression of malignant bone disease. *Clin Chem Lab Med* 1998, 36:879-85.
- Demers LM. Clinical usefulness of markers of bone resorption and formation. *Scand J Clin Lab Invest* 1997, 227:12-20.
- Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988, 26:783-90.
- Fenkci V, Yilmazer M, Fenkci S. Effects of short-time (3 months) tibolone treatment on bone turnover in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet.* 2003 Jun;268(2):85-7. Epub 2002 Aug 21.
- Rymer J, Robinson J, Fogelman I. Effects of 8 years of treatment with tibolone 2.5 mg daily on postmenopausal bone loss. *Osteoporos Int.* 2001;12(6):478-83.
- Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Monteleone P, Benussi C, Bevilacqua G, Genazzani AR. A longitudinal evaluation of the effect of two doses of tibolone on bone density and metabolism in early postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2004 Jan;18(1):9-16.
- Ederveen AG, Kloosterboer HJ. Tibolone exerts its protective effect on trabecular bone loss through the estrogen receptor. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1651-7.
- Gallagher JC, Baylink DJ, Freeman R, McClung M. Prevention of bone loss with tibolone in postmenopausal women: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Oct;86(10):4717-26.

- Delmas PD, Davis SR, Hensen J, Adami S, van Os S, Nijland EA. Effects of tibolone and raloxifene on bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2008 Aug;19(8):1153-60.
- Tuppurainen M, Härmä K, Komulainen M, Kiviniemi V, Kröger H, Honkanen R, Alhava E, Jurvelin J, Saarikoski S. Effects of continuous combined hormone replacement therapy and clodronate on bone mineral density in osteoporotic postmenopausal women: a 5-year follow-up. *Maturitas.* 2010 Aug;66(4):423-30.
- Arrenbrecht S, Caubel P, Garnero P, Felsenberg D. The effect of continuous oestradiol with intermittent norgestimate on bone mineral density and bone turnover in post-menopausal women. *Maturitas.* 2004 Jul 15;48(3):197-207.
- Popp AW, Bodmer C, Senn C, Fuchs G, Kraenzlin ME, Wyss H, Birkhaeuser MH, Lippuner K. Prevention of postmenopausal bone loss with long-cycle hormone replacement therapy. *Maturitas.* 2006 Jan 20;53(2):191-200.
- Warming L, Ravn P, Christiansen C. Levonorgestrel and 17beta-estradiol given transdermally for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Maturitas.* 2005 Feb 14;50(2):78-85.