

Peran pertanda tulang dalam serum pada tatalaksana osteoporosis

Adi Priyana*

ABSTRAK

* Bagian Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran
Universitas Trisakti

Korespondensi

Dr. dr. Adi Priyana, Sp.PK
Bagian Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran
Universitas Trisakti
Jl. Kyai Tapa No.260, Grogol
Jakarta 11440
Telp. 021-5672731, eks. 2404
Email: adipr@indo.net.id

Universa Medicina 2007; 26:152-9.

Osteoporosis adalah kelainan tulang yang kronik progresif akibat berkurangnya massa dan kekuatan tulang sehingga menjadi predisposisi meningkatnya risiko fraktur. Pertanda tulang dapat memberikan gambaran proses remodelling yang sedang terjadi. Pemeriksaan ini meliputi pertanda resorpsi tulang yang dilakukan oleh osteoklas dan pertanda formasi tulang yang dilakukan oleh osteoblas. Diagnosis untuk osteoporosis yang dianggap baku adalah pemeriksaan *bone mass density* (BMD) tetapi BMD tidak dipakai untuk monitoring pengobatan karena membutuhkan waktu lama (2 tahun) untuk melihat perbedaan gambaran massa tulang. Analisis pertanda tulang dapat memberikan gambaran proses remodeling yang sedang terjadi dalam waktu yang lebih singkat (3 – 6 bulan). Artinya analisis pertanda tulang dapat memantau dan menilai respons pengobatan, prognosis penderita dengan risiko osteoporosis, mencari penyebab berkurangnya tulang secara cepat, memilih pengobatan yang sesuai, memantau pasien dengan pengobatan kortikosteroid dan mempelajari patogenesis osteoporosis. Dalam tulisan ini akan diuraikan beberapa analisis pertanda tulang seperti *alkaline phosphatase* (ALP), osteocalcin, P1-NP dan β -CrossLaps dan kegunaannya pada tatalaksana osteoporosis.

Kata kunci: Osteoporosis, pertanda tulang, osteocalcin, P1-NP dan β -CrossLaps

Role of serologic bone marker in osteoporosis management

Adi Priyana*

ABSTRACT

*Department of Clinical
Pathology
Faculty of Medicine
University of Trisakti

Correspondence

Dr. dr. Adi Priyana, Sp.PK
Department of Clinical
Pathology
Medical Faculty
Trisakti University
Jl. Kyai Tapa No.260 Grogol
Jakarta 11440
Phone : 021-5672731 ex.2404
Email: adipr@indo.net.id

Osteoporosis is a skeletal disorder with reduced bone density and strength. This lead increased risk of fracture. Osteoporosis can be classified as primary and secondary osteoporosis. Primary osteoporosis is found in menopausal women due to reduced estrogen hormone, and in men due to reduced calcium. Many primary diseases can cause secondary osteoporosis. Bone mass density can be considered as a standard examination for osteoporosis but it is still controversial because it need more than 2 years to differentiate bone mass. But bone marker examination can give description of remodelling process in bones only for 3–6 months, such as bone resorption by osteoclast and bone formation by osteoblasts. Bone marker analysis can support the diagnosis of osteoporosis, therapeutic response, identify the causal factors, select the mode of therapy, and study the pathogenesis of osteoporosis. In this review some bone markers such as alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin, P1-NP, and β -CrossLaps and their use in osteoporosis will be described.

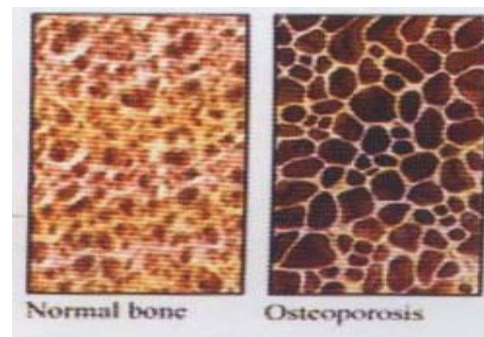
Keywords: *Osteoporosis, bone marker, osteocalcin, P1-NP dan β -CrossLaps*

Universa Medicina 2007; 26: 152-9.

PENDAHULUAN

Jumlah penduduk Indonesia akan meningkat lebih dari empat kali sejak tahun 1990–2025. Meningkatnya derajat kesehatan akan mengakibatkan terjadinya ledakan penduduk usia lanjut terutama wanita pada usia menopause. Tulang adalah organ tubuh yang selalu mengalami proses pergantian (*turnover*), tulang lama diganti dengan tulang baru yaitu terjadi proses resorpsi dan proses formasi. Bila terjadi ketidakseimbangan antara proses resorpsi tulang oleh osteoklas dan proses formasi oleh osteoblas maka akan terjadi osteopenia. atau osteoporosis. Osteoporosis adalah kelainan tulang yang bersifat kronik progresif akibat berkurangnya massa tulang sehingga terjadi penurunan kekuatan tulang yang menjadi

predisposisi meningkatnya risiko fraktur. Struktur tulang bagian dalam tampak perbedaan kepadatan tulang antara normal dengan osteoporosis (Gambar 1).



Gambar 1. Gambaran tulang pada orang normal dan osteoporosis ⁽⁵⁾

Kualitas tulang ditentukan oleh empat faktor penting yaitu densitas tulang (*bone density*), ukuran tulang, pergantian tulang (*bone turnover*) dan geometri tulang (mikroarsitektur). Banyak faktor yang mempengaruhi pembentukan tulang seperti kalsium dan vitamin D, hormon paratiroid, kalsitonin yang diproduksi kelenjar tiroid, estrogen dan testosteron. Faktor yang meningkatkan kerja osteoklas sehingga terjadi *bone resorption* adalah hormon glukokortikoid. Osteoporosis diklasifikasikan dalam 2 kelompok yaitu osteoporosis primer dan sekunder. Osteoporosis primer terdapat pada wanita menopause (*post menopause osteoporosis*) karena berkurangnya hormon estrogen. Pada pria usia lanjut (*senile osteoporosis*) akibat berkurangnya kalsium. Osteoporosis sekunder disebabkan oleh berbagai penyakit primer seperti penyakit Cushing, hipertiroid, hiperparatiroid, hipogonadisme, gagal ginjal kronis, kurang aktivitas, alkoholisme, pemakaian obat golongan kortikosteroid, perokok dan kelebihan kafein.⁽¹⁻⁴⁾ Osteoporosis sendiri umumnya tidak menimbulkan keluhan tetapi manifestasi klinisnya yang berat adalah terjadinya fraktur akibat berkurangnya kekuatan tulang yang menjadi predisposisi meningkatnya risiko fraktur. Pemeriksaan *bone mass density* (BMD) merupakan pemeriksaan baku emas (*gold standard*) oleh *World Health Organization* (WHO) untuk diagnosis osteoporosis, tetapi kurang bermanfaat untuk memantau pengobatan osteoporosis.⁽¹⁻⁴⁾

Analisis pertanda tulang

Terdapat empat faktor penting untuk menilai kualitas tulang yaitu densitas tulang (*bone density*), pergantian tulang (*bone turnover*), ukuran tulang dan geometri tulang (mikroarsitektur). Pergantian tulang atau remodelling terdiri dari resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas. Pergantian tulang yang meningkat

akan mempercepat porositas tulang. Kombinasi pembentukan dan resorpsi tulang akan menentukan massa tulang dan osteoporosis.

Jeannettee⁽⁶⁾ menyatakan bahwa terdapat lebih dari 75 juta penderita osteoporosis di Amerika, Eropa dan Jepang dengan kejadian fraktur 1,3 juta setiap tahunnya. Teknik yang baik untuk menilai densitas tulang adalah dengan metode pemeriksaan *Dual-energy x-ray absorptiometry* (Dxa) dan *Quantitative Computerized Tomography* (CT).⁽⁷⁻⁹⁾ Kedua metode tersebut memiliki tingkat kesalahan hanya 0,5 – 2 persen dan dianjurkan untuk dipakai sebagai alat diagnosis. Walaupun pemeriksaan CT lebih sensitif tetapi lebih banyak terjadi radiasi sehingga para ahli lebih memilih pemeriksaan Dxa. Pemeriksaan densitas tulang dianjurkan dilakukan pada wanita perimenopause yang akan memulai pengobatan dengan hormon, pasien yang lama memakai glukokortikoid, hiperparatiroid dan sebagai alat untuk memantau mereka yang diberikan pengobatan untuk osteoporosis. Meskipun pemeriksaan Dxa memiliki presisi tinggi untuk menentukan bagian tulang yang mengalami osteoporosis, tetapi pemeriksaan Dxa hanya dapat melihat proses penurunan massa tulang pada tahap lanjut. Banyak peneliti lebih memilih analisis pertanda tulang untuk mengelola osteoporosis.⁽⁹⁻¹¹⁾

Kini dikenal pemeriksaan pertanda tulang (*bone marker*) seperti *ostocalcin*, β -CrossLaps, PINP dan alkali fosfatase. Berbeda dengan pemeriksaan BMD, tujuan analisis pertanda tulang adalah untuk memantau dan menilai respons pengobatan, diagnosis penderita dengan risiko osteoporosis, mencari penyebab berkurangnya tulang secara cepat, memilih pengobatan yang sesuai, memantau pasien dengan pengobatan kortikosteroid dan mempelajari patogenesis osteoporosis.⁽¹⁻⁴⁾

Pertanda tulang dapat memberikan gambaran proses remodelling yang sedang

terjadi. Pemeriksaan ini meliputi pertanda resorpsi tulang (*resorption bone marker*) yang dilakukan oleh osteoklas dan pertanda formasi tulang (*formation bone marker*) yang dilakukan oleh osteoblas. Pemeriksaan pertanda tulang dapat dilakukan terhadap bahan serum atau urin.⁽⁴⁾ Dilakukan pada usia >40 tahun, sebelum diberikan terapi antiresorpsi oral (obat penghambat penyerapan tulang) dan 3 bulan setelah terapi antiresorpsi oral, untuk mengetahui keberhasilan pengobatan.⁽⁶⁻⁸⁾ Apurva *et al*⁽¹²⁾ menganjurkan memakai pertanda tulang sebagai cara untuk mengelola osteoporosis dengan alasan: (i) dapat menilai proses remodeling dan tingkat kecepatan hilangnya tulang; (ii) BMD tidak mampu memprediksi risiko fraktur pada pengobatan osteoporosis; (iii) dapat menilai respons pengobatan dalam 3–6 bulan.

Pemeriksaan pertanda tulang sebaiknya dilakukan dalam keadaan puasa walaupun hanya terdapat sedikit perbedaan kadarnya dengan setelah makan.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Pemeriksaan pertanda tulang dapat dikerjakan dengan bahan urin atau serum. Bahan tersebut dapat disimpan pada suhu kamar selama 48 jam, 2–8°C selama seminggu dan bila dibekukan masih dapat diperiksa setelah 6 bulan.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Jung⁽¹⁹⁾ membuktikan bahwa analisis pertanda tulang dapat dipakai sebagai alat untuk memantau metastase ke tulang dari karsinoma prostat. Termasuk pertanda pembentukan tulang adalah alkali fosfatase, osteocalcin, P1N-terminal propeptide (P1NP). Pertanda resorpsi tulang adalah pyridium cross-links, collagen I C-terminal telopeptide β (β -CrossLaps). Akan diuraikan disini *Alkaline phosphatase* (ALP), osteocalcin, P1-NP dan β -CrossLaps karena ketiganya dapat diperiksa di laboratorium dari bahan darah dan urin.⁽²⁰⁻²³⁾

Alkaline phosphatase

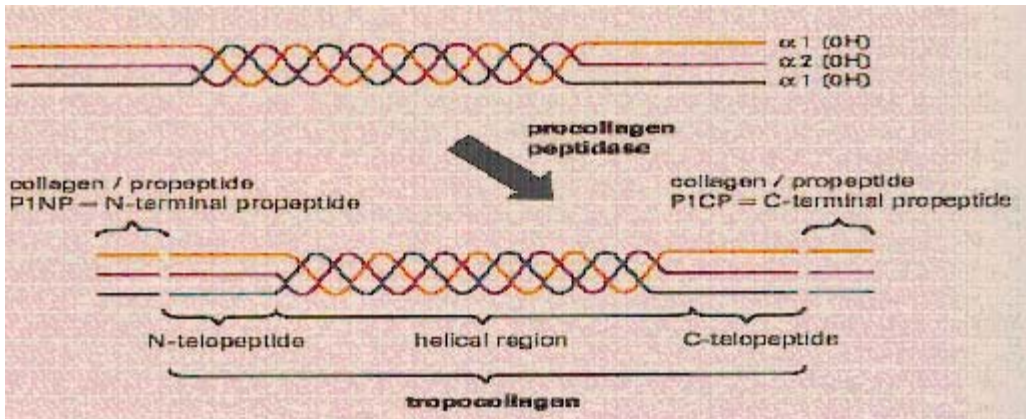
Serum *alkaline phosphatase* (ALP) terdiri dari beberapa isoensim yang terdapat pada

banyak organ seperti hati, tulang, ginjal, usus dan placenta. ALP hati dan tulang kadarnya tinggi dalam serum sehingga banyak dipakai untuk menilai proses metabolisme tulang khususnya menilai dan memantau aktivitas osteoblas dan untuk menilai kelainan pada hepatobilier. Nilai normal: pria 90–239 μ /L dan wanita di bawah 45 tahun 76–196 μ /L dan wanita >45 tahun 87–250 μ /L.⁽⁸⁾

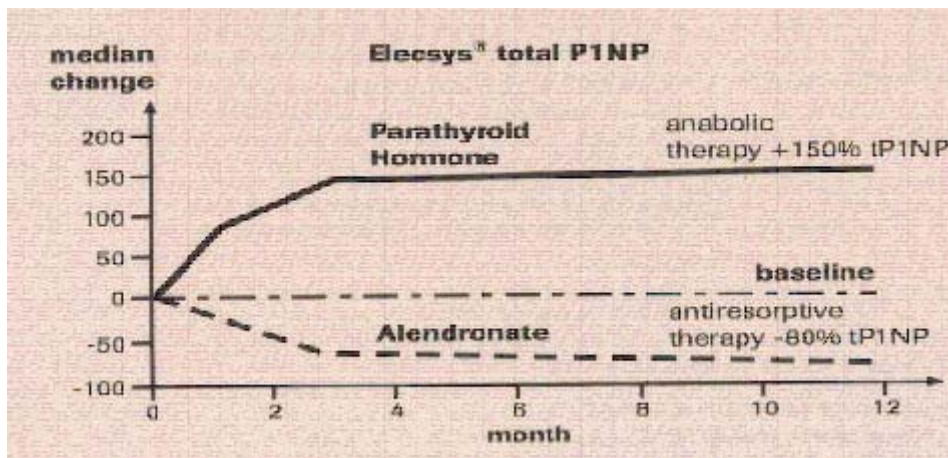
Lebih spesifik lagi bila melakukan pemeriksaan isoensim dari ALP karena akan menggambarkan kelainan masing-masing isoensim yang diproduksi oleh organ tertentu. Reid IR *et al*⁽¹⁶⁾ memakai pemeriksaan pertanda tulang ini sebagai marker osteoblas pada pengobatan penyakit Paget dengan bisphosphonat. Pemeriksaan isoensim dilakukan dengan cara khusus yaitu teknik elektroforesis dan kadar isoensim ALP tulang adalah 20–120 μ /L.

Procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP)

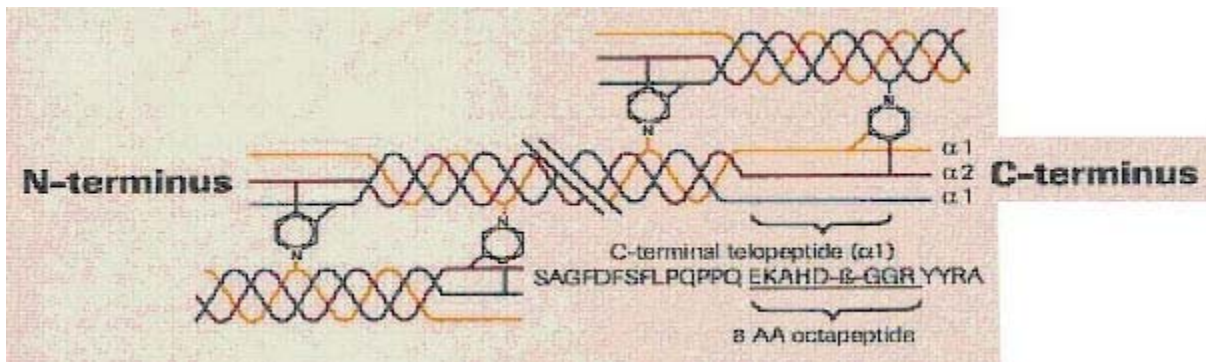
Lebih dari 90% matriks organik tulang berisi *type 1 collagen* yang akan dibentuk menjadi tulang. *Type 1 collagen* berasal dari *type 1 procollagen* yang dihasilkan fibroblas dan osteoblas. *Type 1 procollagen* mengandung *N-amino dan C carboxy terminal propeptida* yang akan diuraikan oleh enzim protease selama terjadi perubahan *procollagen* menjadi collagen dan kemudian dibentuk matriks tulang (Gambar 2). Pertanda tulang P1NP merupakan indikator spesifik dan alat prediktor untuk menilai pembentukan tulang. P1NP dilepas selama pembentukan *type 1 collagen* dan akan masuk ke dalam aliran darah.^(20,21) Pasien yang diobati dengan pengobatan anabolik akan meningkatkan kadarnya (Gambar 3). Braso⁽²³⁾ memakai pertanda tulang ini dalam pengobatan karsinoma prostat. Nilai normal P1NP: 5–1200 μ g/L atau ng/ml.^(24,25)



Gambar 2. P1NP dilepas ke dalam darah dan urine pada saat pembentukan tulang⁽²⁶⁾



Gambar 3. Pemantauan pengobatan anabolik meningkatkan kadar P1NP⁽²⁶⁾



Gambar 4. β -CrossLaps dilepas dari kolagen tipe 1 pada saat resorpsi tulang⁽²⁷⁾

β -CrossLaps

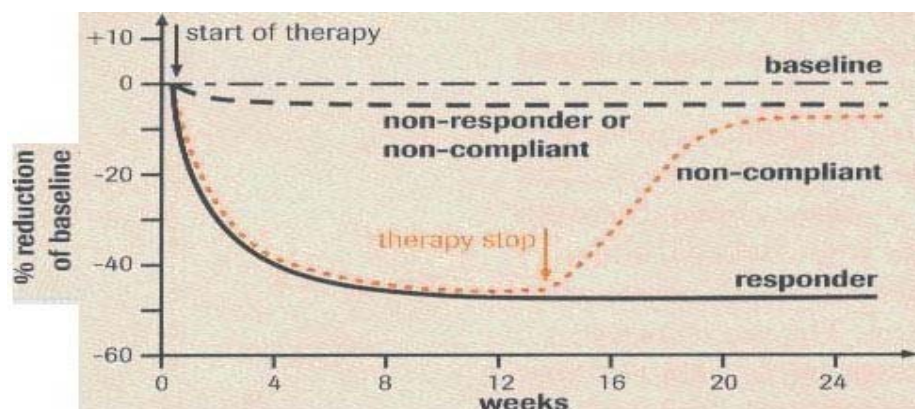
Saat ini telah dikembangkan pemeriksaan β -CrossLaps yang dapat digunakan sebagai marker resorpsi tulang yang sensitif dan spesifik. Sensitivitas mencapai >70% dan spesifisitas 80%. β -CrossLaps adalah hasil pemecahan protein kolagen tipe 1 yang spesifik tulang dan merupakan produk metabolisme atau pembongkaran tulang secara langsung. Perombakan tulang yang dilakukan oleh osteoklas akan menghancurkan kolagen tipe 1 dan terbentuk bentuk α dan β . Bentuk β ini disebut β -CrossLaps dan kadarnya dapat diukur dari serum, plasma atau urin (Gambar 4).

Kadar β -CrossLaps dipengaruhi usia, jenis kelamin dan siklus sirkadian dengan puncak tengah malam dan kadar terendah sore hari. Diduga pada saat puncak kadarnya 66% lebih tinggi dibandingkan dengan kadar rata-rata. Pemeriksaan β -CrossLaps dapat dipakai sebagai alat pemantau terapi terutama pada pengobatan dengan anti-resorptif seperti bisphosphonate. Dalam waktu 3 minggu seharusnya terjadi penurunan kadar β -CrossLaps dalam darah atau urin sehingga dokter yang memberi pengobatan dapat memprediksi hasil pengobatan (Gambar 5). Pemeriksaan kadar β -CrossLaps lebih sensitif dalam menilai perbaikan metabolisme tulang dibandingkan dengan pemeriksaan BMD.⁽⁸⁾

Teknik pemeriksaan β -CrossLaps dengan cara *electrochemiluminescent sandwich immunoassay*. Nilai normalnya: pria usia 30–50 tahun: 0,016 – 0,584 ng/ml. Usia 50–70 tahun: 0,104 – 0,704 ng/ml sedang usia >70 tahun: 0,104 – 0,854 ng/ml. Wanita premenopause: 0,025 – 0,573 ng/ml dan pasca menopause: 0,104 – 1,008 ng/ml.^(26,27,28)

N-mid Osteocalcin

Osteocalcin merupakan protein non-kolagen yang terdapat paling banyak dalam tulang dan diproduksi sel osteoblas. *Osteocalcin* berperan penting dalam proses mineralisasi dan proses homeostasis ion kalsium. Maka pemeriksaan *osteocalcin* merupakan parameter yang baik untuk menentukan gangguan metabolisme tulang pada saat pembentukan tulang dan penggantian tulang (*bone turn over*). Pemeriksaan *osteocalcin* sering dipakai sebagai biomarker awal pada pengobatan obat pembentuk tulang dan untuk menilai efektivitas hasil pengobatan. Hasil pemeriksaan *osteocalcin* cukup akurat dan stabil dalam menilai proses pembentukan tulang. Metode pemeriksaan *osteocalcin* adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Nilai normalnya adalah: $10,1 \pm 9,4$ ng/ml.^(11,17,19)



Gambar 5. β -CrossLaps sebagai pertanda sensitif pada pengobatan antiserorptif⁽²⁷⁾

PENGobatan

Banyak obat yang bisa dipakai baik untuk pengobatan osteoporosisnya maupun untuk mengurangi dampak negatif akibat osteoporosis seperti biphosphonate, kalsium dan vitamin D, estrogen, *selective estrogen receptor modulator*, kalsitonin, strontium ranelate, raloxifene, alendronate dan hormon paratiroid.^(1,28-30)

Terapi sulih hormon masih merupakan pilihan antara pemakaian estrogen kimiawi atau estrogen alami (fitoestrogen) tetapi beberapa peneliti menganjurkan pemakaian terapi sulih hormon untuk penderita osteoporosis.^(1,2, 30-33)

Perubahan gaya hidup seperti menu diet banyak mengandung kalsium dan vitamin D, sinar matahari dan banyak latihan fisik yang memakai beban ringan.^(24,28,34,35)

KESIMPULAN

Osteoporosis adalah kelainan tulang akibat berkurangnya kekuatan tulang yang menjadi predisposisi meningkatnya risiko tetapi osteoporosis memberikan manifestasi klinisnya yang berat yaitu terjadinya fraktur. Pemeriksaan *bone mass density* (BMD) dianggap sebagai pemeriksaan baku emas (*gold standard*) oleh WHO untuk diagnosis osteoporosis tetapi kurang bermakna dalam memantau hasil pengobatan. Petanda tulang merupakan pemeriksaan pelengkap dan pengukuran BMD pada penatalaksanaan osteoporosis. Manfaat potensial dari pertanda tulang adalah untuk menentukan pemberian pengobatan dan memantau efektifitas pengobatan.

Daftar Pustaka

1. Mauck K, Clarke BL. Diagnosis, screening, prevention and treatment of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 662-72.
2. Rachman IA. Menopause, osteoporosis dan terapi sulih hormon, pada Simposium Pendidikan berkesinambungan Patologi klinik 2005, Jakarta 2005;1–28.
3. Suryaatmadja M. Peran pertanda tulang pada pengelolaan osteoporosis. Simposium Pendidikan berkesinambungan Patologi klinik 2005, Jakarta 2005; 29–41.
4. Endres DB, Rude RK. Mineral and bone metabolisme (Bab 4) from Burtis CA, Ashwood ER, Tietz. *Textbook of clinical chemistry*, Editor: NW Tietz. 2nd ed WB Saunders co. Philadelphia 1994; 1879–1973.
5. Kleerekoper M, Camcho P. Monitoring osteoporosis therapy. *Clin Chem* 2005; 51, 2227-8.
6. Jeannettee SP. Evaluation and assessment of osteoporosis. *Am Family Physician* 2001; 63: 897-904.
7. Genant HK. Current state of bone densitometry for osteoporosis radiographyc. 1998; 18: 913-8.
8. Blake GM, Fogelman I. Application of bone densitometry for osteoporosis. *Endocrineol Metab Clin North Am.* 1998; 27: 267-88.
9. National Osteoporosis Foundation. *Physician's guide to prevention and treatment of osteoporosis.* Washington DC The foundation; 1998.
10. Stone KL, Lui LY, Ensrud K, Browner WS. Osteoporotic fractures research group. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types; Long term results from the study of osteoporotic fracture. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1947-54.
11. Chailurkit L, Ongphiphadhanakul B, Piaseu N, Saetung S, Rajatanavin R. Biochemical markers of bone turnover and response of bone mineral density to intervention in early postmenopausal women: an experience in clinical laboratory. *J Clin Chem* 2001; 47: 1083-8.
12. Apurva K, Srivastava, Elizabeth L, Vliet, Michael L, Maricic M, et al. Clinical use of serum and urine bone markers in the management os osteoporosis. *Current Med Res Opin* 2005; 21. 1015–25.
13. Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, Eastell R. Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *JBMR* 2004; 13: 1124–35.
14. Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone*, 2002; 30: 886–90.

15. Blumsohn A, Naylor KE, Timm W, Eagleton AC, Hannon RA, Eastell R. Absence of marked seasonal change in bone turnover: a longitudinal and multicenter cross-sectional study. *JBMR*. 2003; 18:1274–81
16. Lomen A, Bolner A. Stability of several biochemical markers of bone metabolism. *Clin Chem* 2000; 46: 1200–2.
17. Panteghini M, Pagani F. Biological variation in bone-derived biochemical markers in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 609–16.
18. Tanko, Handsdottir, Sornay R. The use of biochemical markers. *Bone* 2003; 6: 87–93.
19. Jung K, Lein M, Stephan C, Hosslin KV, Semjonow A, Loening SA et al. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int J Cancer*. 2004; 111: 783–91.
20. Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Bouc L, Sourbelerbielle C. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporosis Int* 2000; 11: 295–303.
21. Rosen C, Chestnut C, Mallinak N. The predictive value of biochemical markers of bone turnover for bone mineral density in early postmenopausal women treated with replacement of calcium supplementation. *J. Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 1904-10.
22. Reid IR, Davidson JS, Wattie D, Wu F, Lucas J, Gamble GD, et al. Comparative responses of bone turnover markers to bisphosphonate therapy in Paget's disease of bone. *Bone*. 2004; 11: 224–36.
23. Brasso K, Johansen J, Christensen J, Teisner B, Price P. High serum levels of PINP, bone alkaline phosphatase and cancer are associated to short survival. *Proc Soc Am Clin Oncol*. 2003
24. Delmas P, Eastell R, Garnero P, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Int Osteopor Foundation*. 2002; suppl 6: S 2-17.
25. Thurairaja R, Iles RK, Jefferson K, McFarlane JP, Persad RA. Serum aminoterminal propeptide of type 1 procollagen (PINP) in prostate cancer: a potential predictor of bone metastase and prognosticator for disease progression and survival. *Urol Int* 2006; 76: 67-71.
26. Roche diagnostics, Elecsys bone marker testing, going straight for answer. 1998.
27. Hegedus D, Ferencz V, Lakatos PL, Meszaros S, Lakatos P, Horvath C, et al. Decreased bone density, elevated serum osteoprotegerin and beta cross-laps in Wilson disease. *JBMR*: 2002; 17: 1961–7.
28. Black D, Susan L, Greenspan MD, Kristine E, Ensrud, Palermo L, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *JBMR*, 2003; 349: 1207–15.
29. Jehle J, Zanetti A, Muser J, Hulter N, Krapf R. Partial neutralization of the acidogenic western diet with potassium citrate increases bone mass in postmenopausal women with osteopenia. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 7: 3213–22.
30. Delmas PD, Hardy P, Garbero P, Dain MP. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* 1998; 23: 360-1.
31. Raven P, Christensen JO, Blaumann M, Clemensen B. Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone*. 1998; 22: 559–64.
32. Comings SR, Black D, Krager KA. The effect of raloxifen on risk of breast cancer in post menopausal women. *JAMA* 1999; 281: 2189-98.
33. Libermann EA, Weiss SR, Bicol. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fracture in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J. Med*. 1995; 333: 1427-43.
34. Outila TA, Karkkainen MU, Seppanen RH. Dietary intake of vitamin D in premenopausal healthy vegans was insufficient to maintain concentration of serum 25 hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone within normal ranges during winter in Finland. *J Am Diet Assoc* 2000; 100: 434–41.
35. Cranney A, Wells G, Wilan. Metaanalysis of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002; 23: 508–16.