

miRs present in the serum/plasma may be within exosomes and/or bound to Argonaut proteins. To identify biomarkers in disease we are in an era of extensive miR expression profiling. Differences in sample preparation, RNA isolation and miR expression methods contribute to the heterogeneity of published miR expression profiles in disease states. There is one 64 miR panel in current clinical use for identification of metastasis of unknown origin [9].

Differential expression of miRs has been demonstrated in many diseases. The miRs often have biological function in the phenotypes of the disease. Therefore, miRs are targets for therapeutic development either by a miR mimic, anti-miR (inhibitor) or sponge (inhibitor) [10]. There is one such anti-miR in clinical use that inhibits the activity of miR-122 in the liver of hepatitis C patients [11]. miR-122 is only expressed in liver and is necessary for HCV replication. Patients treated with the anti-miR-122 have sustained reduction in the HCV virus levels.

Research from my lab has focused on miRs in the prostate. We have identified tumor suppressive miRs that are regulated by vitamin D in both primary epithelial prostate cells and in laser-capture micro-dissection prostate epithelium from vitamin D clinical trial patients [12]. We have also identified a panel of miRs in the serum of prostate cancer patients that predicts the absence of aggressive disease [13].

In summary, this is an exciting time in miR research in which the knowledge of basic biology and clinical applications are rapidly expanding. It is likely that current studies have only begun to reveal the true biological functions of miRs.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5. PubMed PMID: 15372042.
2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. PubMed PMID: 19167326. Pubmed Central PMCID: 3794896.
3. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1124-8. PubMed PMID: 18806776.
4. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1931-4. PubMed PMID: 18048652.

5. Huang V, Zheng J, Qi Z, Wang J, Place RF, Yu J, et al. Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. *PLoS genetics*. 2013;9(9):e1003821. PubMed PMID: 24086155. Pubmed Central PMCID: 3784563.

6. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Feb 5;105(5):1608-13. PubMed PMID: 18227514. Pubmed Central PMCID: 2234192.

7. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jul 29;105(30):10513-8. PubMed PMID: 18663219. Pubmed Central PMCID: 2492472.

8. Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L, Gann PH. mRNA and micro-RNA expression analysis in laser-capture microdissected prostate biopsies: valuable tool for risk assessment and prevention trials. *Experimental and molecular pathology*. 2010 Feb;88(1):45-51. PubMed PMID: 19874819. Pubmed Central PMCID: 2815196.

9. Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, Zepeniuk M, Klinke E, Edmonston TB, et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. *The oncologist*. 2012;17(6):801-12. PubMed PMID: 22618571. Pubmed Central PMCID: 3380879.

10. Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Research*. 2013;2:136. PubMed PMID: 24627783. Pubmed Central PMCID: 3917658.

11. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*. 2013 May 2;368(18):1685-94. PubMed PMID: 23534542.

12. Giangreco AA, Vaishnav A, Wagner D, Finelli A, Fleshner N, Van der Kwast T, et al. Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and -125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue. *Cancer prevention research*. 2013 May;6(5):483-94. PubMed PMID: 23503652. Pubmed Central PMCID: 3644314.

13. Mihelich BL, Maranville JC, Nolley R, Peehl DM, Nonn L. Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. *PloS one*. 2015;10(4):e0124245. PubMed PMID: 25874774. Pubmed Central PMCID: 4396984.

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОСТИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

PROF. DIDIER HANS

Center of Bone diseases, Bone and Joint Department, Lausanne University Hospital, Lausanne Switzerland.



Seeman E. и соавт. [1] сформулировали понятие хрупкости костей следующим образом: костная ткань способна адаптировать свою форму и размер в ответ на механическую нагрузку через механизм моделирования, при работе которого кости формируются или перестраиваются под независимым действием остеокластов и остеобластов. Ремоделирование – это процесс, поддерживающий механическую стойкость скелета, позволяя селективно восстанавливать и замещать поврежденную костную ткань. В период роста, эти процессы формиру-

ют структуру, способную адаптироваться к нагрузкам и сохранять прочность. С возрастом эти же процессы сопровождаются накоплением нарушений в этом клеточном механизме: недостаток и избыток гормонов, местных ростовых факторов, снижающаяся мышечная масса и физическая активность, недостаточность питания и другие факторы перевешивают возможности ремоделирующего механизма к адаптации скелета к возрастающим нагрузкам.

Нарушения гомеостаза и частоты ремоделирования и ограничения в периостальном взаимоотношении негатив-

но влияют на вещественный состав и структуру кости, и она перестаёт быть «подходящей» для нагрузок, которые она должна выдерживать. Хрупкость костей – это последствие несостоятельной адаптации.

Остеопороз – системное заболевание скелета, характеризующееся низкой костной массой и нарушениями микроархитектоники костной ткани, что приводит к увеличению хрупкости костей (снижению плотности кости) и склонности к переломам. Исследователи и клиницисты продолжают упорно искать способы предотвратить 8 миллионов остеопоротических переломов, происходящих ежегодно по всему миру [2]. Ранняя и точная оценка риска перелома, со своевременным начатым лечением – такой подход выглядит наиболее подходящим для снижения этого количества переломов и ассоциированных с ним персональных и общественных потерь.

Минеральная плотность костной ткани (МПК), измеряемая двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрией (DEXA, денситометрия) – золотой стандарт диагностики остеопороза при отсутствии состоявшихся низкотравматических переломов. МПК – одна из важных детерминант силы костной ткани и риска переломов, однако имеется значительное перекрытие (до 40%) в значениях МПК между группами пациентов, у которых происходят переломы и у тех, у кого не происходят. Фактически, как упоминалось ранее, способность кости противостоять перелому определяется количеством костной ткани (костной массой), пространственным распределением костной массы на кортикальную (макроархитектоника) и трабекулярную кость (микроархитектоника), а также собственными свойствами костного материала (композиция минерального и органического матрикса, микрповреждения и состояние костного восстановления). В связи с этим, предсказывание риска переломов только на основе МПК не является абсолютно достаточным. Как следствие, возрос клинический и научный интерес к дополнительным методам измерения качества кости, которые могли бы улучшить оценку риска переломов [3].

Существует множество методов непосредственной оценки структурной прочности и вещественного состава кости, такие, как тестирование целой кости, костной массы, оценка прочности с помощью микро- и нано-вдавлений [4]. Однако все эти методы используются для исследований, *in vitro* или *ex-vivo* и потому не подходят для клинической практики. Однако в последнее время, микроиндентирование стало позиционироваться как процедура для клинического использования с минимальной инвазивностью [5]. В этом методе индентация (вдавление) кости производится с помощью индентерного наконечника с датчиком глубины. Данные по силе и смещению анализируются для расчета индекса индентации и твердости. Среди преимуществ этого метода – возможность измерения свойств материала и микроструктурных особенностей и выявление локальных изменений в костном материале, вызванных, например, заболеванием или приёмом лекарственных средств. Однако метод остается инвазивным и крайне локальным, поэтому ещё предстоит установить, отражает ли он состояние костей в целом.

Некоторые новые неинвазивные методы визуализации (основанные на КТ или МРТ), такие как элементарный конечный анализ (FEA, element analysis), позволяют получить косвенные данные по качеству кости, которые могут быть использованы для улучшения чувствительности и специфичности оценки риска переломов [6–7]. Первые наблюдения показали, что эти методы дают информацию, которая помогает улучшить понимание патофизиологии хрупкости скелета. Также эти наблюдения позволяют сде-

лать вывод, что эти методики вероятно имеют свою роль в клиническом ведении пациентов с риском переломов. Тем не менее, эти методы остаются непрактичными для широкого скрининга и клинического ведения остеопороза в связи с высокой стоимостью, неудобством для пациентов и с их низкой доступностью для таких заболеваний [8-10].

Гистоморфометрическая оценка костного биоптата из гребня подвздошной кости остаётся золотым стандартом для прямого исследования костной микроархитектоники, но этот метод инвазивен и не трёхмерен. Наибольшая проблема – определить новый метод, который бы позволил эффективно и неинвазивно оценивать микроархитектонику в клинической практике [11].

За прошедшие несколько лет технология DXA значительно продвинулась, как в техническом компоненте, так и в программном обеспечении. Последние поколения систем DXA предоставляют не только точную и воспроизводимую информацию, но и возможность использовать высококачественные DXA-сканы вместо стандартных рентгенограмм для подтверждения и характеристики имеющихся переломов позвоночника, а также оценивать параметры микроархитектоники бедренной кости. Эти макроскопические, геометрические измерения, формирующие факторы риска, независимые от МПК, и возможность их получения из той же DXA – дополнительное преимущество [12-13]. Более того, для достижения уровня нововведений для КТ-сканирования DXA использует элементарный анализ, совмещая геометрию кости с вещественными характеристиками для прогнозирования качества кости – перспективный метод для оценки риска переломов, основанный на биомеханике. Эти параметры, совместно с методами визуализации трабекулярной структуры, могут определённо быть полезными для изучения изменений в качестве костной ткани, возникающих на фоне лечения [14-16].

Очевидно, что разработка нового метода для эффективной, неинвазивной клинической оценки микроархитектоники кости остаётся и ключевой задачей, и затруднительной. Трабекулярный индекс кости (TBS, the trabecular bone score) – новый метод, основанный на использовании вариаций серых 2-D изображений, и способен отличать две трехмерные микроархитектуры с одинаковой плотностью костной ткани, но с разными трабекулярными характеристиками. Было показано, что TBS обладает прямой корреляцией с соотношением объём трабекулярной кости/объём ткани (BV/TV), количеством трабекул и их соединений и обратной корреляцией с пространством между трабекулами и с индексом структурной модели (SMI – измерение костных балок и пластинок в трабекулярной кости). Он также коррелировал с механическим характером (т.е. прочностью) [17-20]. Высокий TBS отражает сильную, устойчивую к переломам микроархитектуру, тогда как низкий TBS – слабую, склонную к переломам [21]. Увеличение ценности рентгеновской денситометрии для оценки риска переломов при добавлении TBS было задокументировано в многоцентровых, проспективных и длительных исследованиях и одобрено Европейским Обществом Клинических и Экономических Аспектов Остеопороза и Остеоартрита [22] и Международным Обществом Клинической Денситометрии [23]. На этих основаниях TBS в настоящее время дополняет традиционную DXA в качестве инструмента для определения свойств трабекулярной кости, а также является регулировочным фактором шкалы FRAX [24-25]. Интервенционные исследования позволяют предположить, что значение TBS имеет тенденцию к повышению на фоне терапии, которая также увеличивает МПК, но величина этих изменений менее заметна, чем

у МПК. Это может отражать различные ответы в зависимости от вида лечения [21-22]. Более того, представляется, что TBS играет важную роль в диагностике вторичного остеопороза [22,23,26].

Знание микроархитектуры кости – ключ к пониманию патофизиологии остеопороза и улучшению его диагностики и лечения; ответ микроархитектурных параметров на лечение должен позволить оценивать реальную эффективность терапии остеопороза. Несмотря на то, что ни один метод не может использоваться для полной характеристики качества кости, существующие неинвазивные методы визуализации могут объединяться с механическими и композиционными методами *ex vivo* для обеспечения полноценного понимания качества кости. Как бы то ни было, в настоящее время лучшим доступным решением для клинической практики является комбинация DXA для оценки костной плотности, в комбинации с индексом микроархитектуры, полученным с помощью TBS. Комбинация этих методов, внутри FRAX или нет, позволяет корректировать стратификацию риска переломов.

Noninvasive assessment of bone quality in clinical routine.

Seeman E. et al. [1] nicely summarized the concept of bone fragility as the following: Bone has the ability to adapt its shape and size in response to mechanical loads via a process known as modelling in which bones are shaped or reshaped by the independent action of osteoblasts and osteoclasts. Remodelling is a process that maintains mechanical integrity of the skeleton, allowing it to selectively repair and replace damaged bone. While during growth, these processes fashion a structure able to accommodate loads and maintain its strength, advancing age is accompanied by accumulating abnormalities in this cellular machinery, hormonal deficiency and excess, deficiency and excess of local growth factors, declining muscle mass and mobility, nutritional deficiencies, and other factors that overwhelm the declining ability of the remodeling machinery to adapt bone to prevailing loads. Abnormalities in the balance and rate of remodeling and limits to periosteal apposition compromise the material composition and structural design of bone so that it is no longer “just right” for the loads it must endure. Bone fragility is the consequence of failed adaptation.

Osteoporosis is defined as a systemic skeletal disease characterized by a low bone mass and a micro-architectural deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone fragility (decreasing bone strength) and susceptibility to fracture. Researchers and clinicians continue to strive to find ways to better prevent the estimated nine million osteoporosis fractures that occur worldwide each year [2]. Early accurate estimation of fracture risk, with indicated treatment initiated promptly, seems to be the best way to reduce these numbers and associated personal and societal costs.

Bone mineral density (BMD), measured by dual x-ray absorptiometry (DXA), has been the gold standard for osteoporosis diagnosis in the absence of established fragility fractures. BMD is one of the major determinants of bone strength and fracture risk, but there is considerable overlap (up to 40%) exists in BMD values between individuals who develop fractures and those who do not. In fact, as mentioned previously, the ability of a bone to resist fracture depends on the amount of bone present (e.g. bone mass), the spatial distribution of the bone mass as cortical (e.g. macro-architecture) and trabecular bone (e.g. micro-architecture) and the intrinsic properties of the bone material (e.g. composition of mineral and organic matrix, micro-damage and the status of bone repair). As such it is normal that fracture risk prediction on a sole basis on BMD is suboptimal. Subsequently, clinical and

scientific interest has increased in complementary measures of bone quality that could improve fracture risk prediction [3].

There are many methods to assess directly structural strength and material properties such as whole-bone, bulk tissue, micro and nano-indentation testing techniques [4]. However, all these techniques are *in vitro* or *ex-vivo* and therefore are meant to be for research purpose but not clinical routine. Although, recently, nano-indentation has been proposed using minimally invasive procedure for clinical use [5]. In this technique, an indentation test is performed with a depth-sensing indenter tip. The force-displacement data are analyzed to obtain the indentation modulus and hardness. Some advantages of this technique include the capability to measure the material properties of microstructural features and to detect localized changes in bone material properties induced by disease or drug for example. However, it remained invasive and very localized. Therefore, whether it reflects the whole bone integrity or not remains to be validated.

Some of the new high end non-invasive imaging techniques (CT or MRI based), including three-dimensional (3D) assessments of bone density and geometry, microarchitecture and integrated measurements of bone strength such as finite element analysis (FEA), provide indirect estimates of bone strength that can be used to increase the sensitivity and specificity of fracture risk assessment [6-7]. Initial observations have shown that these techniques provide information that will improve our understanding of the pathophysiology of skeletal fragility and suggest that these techniques are likely to have a role in the clinical management of individuals at risk for fracture. Nonetheless, these techniques remain impractical for the routine screening and clinical management of osteoporosis, due to high costs and patient inconvenience, as well as their availability for such diseases. [8-10]

Histomorphometric assessment of iliac crest bone biopsies remains the gold-standard method for the direct assessment of bone micro-architecture, but this technique is invasive and not directly 3D. A major challenge, therefore, has been to develop some novel technique that allows for the efficient, non-invasive clinical evaluation of bone micro-architecture status [11].

Over the past several years, DXA technology has advanced dramatically, in terms of both its hardware and software components. Recent generations of DXA systems provide not only accurate and reproducible measurements of BMD, but also the opportunity to use high-quality DXA scans in place of standard X-rays to confirm and characterize existing vertebral fractures and to assess macro-architecture parameters of the hip. These macroscopic geometrical measurements constitute risk factors that are independent of BMD, and the ability to obtain them from the same DXA examination is an additional advantage [12-13]. Furthermore, to follow-up on what has been developed for CT imaging, DXA based-finite element analysis, by combining bone geometry with material characteristics to predict bone strength, holds promise as a biomechanically based technique for fracture assessment. Such parameters combined with trabecular architecture imaging modalities may be particularly useful in assessing subtle treatment-based changes in bone strength [14-16].

Clearly, developing a novel technique for the efficient, non-invasive clinical evaluation of bone micro-architecture remains both crucial and challenging. The trabecular bone score (TBS) is a novel grey-level texture measurement that is based on the use of experimental variograms of 2D projection images, and is able to differentiate between two 3-dimensional (3D) micro-architectures that exhibit the same bone density, but different trabecular characteristics. TBS has been shown to be strongly correlated with the BV/TV (trabecular bone volume/tissue volume), number of trabeculae and their

connectivity and negatively correlated with the space between trabeculae and with SMI (structure model index is a measure of rods and plates in trabecular bone). It is also correlated with mechanical behavior (e.g. Stiffness) [17-20]. A high TBS reflects strong, fracture-resistant microarchitecture, whereas a low TBS reflects weak, fracture-prone microarchitecture [21]. The added value of the TBS to bone mineral densitometry in fracture risk assessment has been documented in cross-sectional, prospective and longitudinal studies and endorsed by the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis [22] and the International Society of Clinical Densitometry [23]. Based on these characteristics, TBS is now complementing traditional DXA as an additional tool for the determination of trabecular bone properties as well as in the FRAX model as an adjustment factor [24-25]. Intervention studies suggest that TBS tends to increase with treatments that also improve BMD but that the magnitude of change is less marked than that of BMD but could display different responses according to the type of treatment [21-22]. Furthermore, TBS tool seems to have an important role in secondary osteoporosis diagnosis [22,23,26].

Knowledge of bone microarchitecture is a clue for understanding osteoporosis pathophysiology and improving its diagnosis and treatment; the response of microarchitecture parameters to treatment should allow assessment of the real efficacy of the osteoporosis therapy. Although no single method can completely characterize bone quality, current noninvasive imaging techniques can be combined with ex vivo mechanical and compositional techniques to provide a comprehensive understanding of bone quality. Nevertheless, as today the best available solution for clinical routine, is the combination of bone density as assessed by DXA combined with both clinical risk factors and bone microarchitecture index as assessed by TBS. Such combination within FRAX or not, enables to fine tune the risk of fracture stratification.

ЛИТЕРАТУРА

- Seeman E. et al. Bone Quality - The Material and Structural. Basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med* 2006;354:2250-61).
- Johnell O et al. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006;17:1726-33
- Hans D, et al. Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. *J Bone Miner Res.* 2011 Nov;26(11):2762-9. doi: 10.1002/jbmr.499. PMID: 21887701
- Judex S, et al. Combining high-resolution micro-computed tomography with material composition to define the quality of bone tissue. *Curr Osteoporos Rep.* 2003 Jun;1(1):11-9. Review. PMID: 16036060
- Diez-Perez A et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. *J Bone Miner Res.* 2010 Aug;25(8):1877-85. doi: 10.1002/jbmr.73. PMID: 20200991
- Link TM. Osteoporosis imaging: state of the art and advanced imaging. *Radiology.* 2012 Apr;263(1):3-17. doi: 10.1148/radiol.12110462. Review. PMID: 22438439
- Engelke K, et al. Advanced CT based in vivo methods for the assessment of bone density, structure, and strength. *Curr Osteoporos Rep.* 2013 Sep;11(3):246-55. doi: 10.1007/s11914-013-0147-2. Review. PMID: 23712690.
- Engelke K et al. Clinical Use of Quantitative Computed Tomography (QCT) of the Hip in the Management of Osteoporosis in Adults: the 2015 ISCD Official Positions-Part I. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):338-58. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.012. PMID: 26277851
- Zysset P et al. Clinical Use of Quantitative Computed Tomography-Based Finite Element Analysis of the Hip and Spine in

the Management of Osteoporosis in Adults: the 2015 ISCD Official Positions-Part II. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):359-92. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.011. PMID: 26277852

10. Engelke K, Lang T, Khosla S, Qin L, Zysset P, Leslie WD, Shepherd JA, Shousboe JT. Clinical Use of Quantitative Computed Tomography-Based Advanced Techniques in the Management of Osteoporosis in Adults: the 2015 ISCD Official Positions-Part III. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):393-407. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.010. PMID: 26277853

11. Kulak CA et al. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Mar;54(2):87-98. Review. PMID: 20485895

12. Broy SB et al. Fracture Risk Prediction by Non-BMD DXA Measures: the 2015 ISCD Official Positions Part 1: Hip Geometry. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):287-308. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.005. PMID: 26277848

13. Shepherd JA et al. Executive Summary of the 2015 ISCD Position Development Conference on Advanced Measures From DXA and QCT: Fracture Prediction Beyond BMD. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):274-86. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.013. PMID: 26277847

14. Boehm HF et al. Differentiation between post-menopausal women with and without hip fractures: enhanced evaluation of clinical DXA by topological analysis of the mineral distribution in the scan images. *Osteoporos Int* 2007; 18: 779-787.

15. Langton CM et al. Comparison of 3D finite element analysis derived stiffness and BMD to determine the failure load of the excised proximal femur. *Med Eng Phys* 2009; 31: 668-672.

16. Yang L et al. Prediction of incident hip fracture with the estimated femoral strength by finite element analysis of DXA Scans in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2014 Dec;29(12):2594-600. doi: 10.1002/jbmr.2291. PMID: 24898426

17. Hans D et al. Correlations between trabecular bone score, measured using anteroposterior dual-energy X-ray absorptiometry acquisition, and 3-dimensional parameters of bone microarchitecture: an experimental study on human cadaver vertebrae. *J Clin Densitom* 2011;14:302-12.

18. Roux JP et al. The predictive value of trabecular bone score (TBS) on whole lumbar vertebrae mechanics: an ex vivo study. *Osteoporos Int* 2013;24:2455-60.

19. Muschitz C et al. TBS reflects trabecular microarchitecture in premenopausal women and men with idiopathic osteoporosis and low-traumatic fractures. *Bone* 2015;79:259-66.

20. Winzenrieth R et al. Three-dimensional (3D) microarchitecture correlations with 2D projection image gray-level variations assessed by trabecular bone score using high-resolution computed tomographic acquisitions: effects of resolution and noise. *J Clin Densitom* 2013;16:287-96.

21. Silva BC et al. Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image. *J Bone Miner Res* 2014;29:518-30.

22. Harvey NC et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. *Bone.* 2015; May 16. [Epub ahead of print].

23. Silva BC et al. Fracture Risk Prediction by Non-BMD DXA Measures: the 2015 ISCD Official Positions Part 2: Trabecular Bone Score. *J Clin Densitom.* 2015 Jul-Sep;18(3):309-30. doi: 10.1016/j.jocd.2015.06.008.

24. McCloskey EV et al. Adjusting fracture probability by trabecular bone score. *Calcif Tissue Int.* 2015 Jun;96(6):500-9. doi: 10.1007/s00223-015-9980-x. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25796374

25. McCloskey EV et al. A meta-analysis of trabecular bone score in fracture risk prediction and its relationship to FRAX. *J Bone Miner Res.* 2015 Oct 24. doi: 10.1002/jbmr.2734. [Epub ahead of print]

26. Ulivieri FM et al. Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. *Endocrine.* 2014 Nov;47(2):435-48. doi: 10.1007/s12020-014-0280-4. Epub 2014 May 23. Review. PMID: 24853880