

OSTEOLOGICKÝ BULLETIN

Časopis věnovaný problematice skeletu

REDAKČNÍ RADA

Šéfredaktor:

Prof. MUDr. Milan Bayer, CSc., Hradec Králové

Zástupce šéfredaktora:

Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc., Pardubice

Užší rada:

MUDr. Jan Rosa, Praha

Doc. MUDr. Václav Vyskočil, Ph.D., Plzeň

Členové:

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Petr Broulík, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Rastislav Džurík, DrSc., Bratislava, SR

MUDr. Tomáš Hála, Pardubice

Prof. MUDr. Pavel Horák, CSc, Olomouc

Prof. Roman S. Lorenc, M.D., Ph.D., Warszawa, PL

MUDr. Pavol Masaryk, CSc., Piešťany, SR

Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr. h. c.,

Hradec Králové

Prof. MUDr. Juraj Payer Jr., CSc., Bratislava, SR

Prof. Dr. med. Meinrad Peterlík, Wien, A

Jonathan Reeve, DM, DSc, FRCP, Cambridge, UK

Prof. MUDr. Jozef Rovenský, DrSc., Piešťany, SR

Prof. Leon Sokoloff, M.D., Setauket, USA

MUDr. Ivo Sotorník, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Ivana Žofková, DrSc., Praha



OBSAH

ÚVODNÍK

Š. Kutílek

131

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu – souhrn poznatků

P. Živný, K. Švejkovská, I. Gradošová, H. Živná, V. Palička

132

PŮVODNÍ PRÁCE

Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů

H. Živná, P. Živný, I. Gradošová, K. Švejkovská, O. Živný, V. Palička

137

Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů – pilotní studie

K. Švejkovská, I. Gradošová, H. Živná, K. Doubková, P. Živný, E. Čermáková, V. Palička

141

Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar

P. Živný, H. Živná, I. Gradošová, K. Švejkovská, S. Hubená, V. Palička

148

Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii

I. Gradošová, H. Živná, P. Živný, S. Hubená, K. Švejkovská, V. Palička

153

INFORMACE

Ze světové literatury

159

RYDAVATEL



Adresa redakce a příjem inzerce:

TRIOS, spol. s r. o.

Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

tel.: 267 912 030, fax: 267 915 563

e-mail: redakce@trios.cz

Redakce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.,

Mgr. Hedvika Nevečeřalová

Inzerce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Sazba: SILVA, s. r. o.

Pod Děkanou 82, Praha 4

e-mail: pfck@bohem-net.cz

Tisk: OMIKRON Praha, spol. s r. o.

U Elektry 650, 190 00 Praha 9-Hloubětín

Vychází 4x ročně.

Povoleno Ministerstvem kultury ČR

pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-3778

Podávání novinových zásilek povolila Česká pošta

s. p., odštěpný závod Praha, č. j. nov. 6063/96

ze dne 9. 5. 1996.

Vydavatel nenesie odpovědnost za údaje a názory

autorů jednotlivých článků nebo inzerce. Současně

si vyhrazuje právo na drobné stylistické úpravy

článků. Zasláné příspěvky se nevracejí, jsou archi-

vovány v redakci TRIOS, na požádání vrátí redakce

obrazovou dokumentaci.

Žádná část tohoto časopisu nesmí být bez před-

chozího písemného souhlasu vlastníka autorských

práv kopírována a rozmnožována za účelem další-

ho rozšiřování v jakékoliv formě či jakýmkoliv způ-

sobem (ať mechanickým, nebo elektronickým –

včetně požívání fotokopíí, nahrávek či informač-

ních databází).

Obrazek na titulní straně: Densitometrie potkana kmene Wistar metodou dvouenergové rentgenové absorpciometrie na přístroji Hologic Delphi [z archivu Mgr. Ivety Gradošové]



OSTEOLOGICAL BULLETIN

A journal devoted to problems of the skeleton

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief:

Prof. MUDr. Milan Bayer, CSc., Hradec Králové

Associate Editor:

Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc., Pardubice

Advisory Board:

MUDr. Jan Rosa, Praha

Doc. MUDr. Václav Vyskočil, Ph.D., Plzeň

Editorial Board:

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Petr Broulík, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Rastislav Dzurík, DrSc., Bratislava, SR

MUDr. Tomáš Hála, Pardubice

Prof. MUDr. Pavel Horák, CSc., Olomouc

Prof. Roman S. Lorenc, M.D., Ph.D., Warszawa, PL

MUDr. Pavol Masaryk, CSc., Piešťany, SR

Prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr. h. c.,
Hradec Králové

Prof. MUDr. Juraj Payer Jr., CSc., Bratislava, SR

Prof. Dr. med. Meinrad Peterliik, Wien, A

Jonathan Reeve, DM, DSc, FRCP, Cambridge, UK

Prof. MUDr. Jozef Rovenský, DrSc., Piešťany, SR

Prof. Leon Sokoloff, M.D., Setauket, USA

MUDr. Ivo Sotorník, DrSc., Praha

Prof. MUDr. Ivana Žofková, DrSc., Praha

PUBLISHER:



Editorial office:

Trios Ltd.

Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

tel.: 267 912 030, fax: 267 915 563

e-mail: redakce@trios.cz

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.,

Mgr. Hedvika Nevečeřalová

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

DTP: SILVA Ltd.

Pod Děkanou 82, Praha 4

e-mail: pfck@bohem-net.cz

Printed by: OMIKRON Praha, spol. s r. o.

U Elektry 650, 190 00 Praha 9-Hloubětín

4 issues per volume.

ISSN 1211-3778

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

The views expressed in this journal are not necessarily those of the Editor or Editorial Board.



CONTENTS

EDITORIAL

Š. Kutílek

131

REVIEW

Assessment of bone biomechanical properties in experimental research

P. Živný, K. Švejkovská, I. Gradošová, H. Živná, V. Palička

132

ORIGINAL ARTICLE

Influence of abdominal surgery (partial hepatectomy) on bone status in male Wistar rats

H. Živná, P. Živný, I. Gradošová, K. Švejkovská, O. Živný, V. Palička

137

Effect of repeated blood withdrawals and iron enriched diet on bone mechanical properties in rats

K. Švejkovská, I. Gradošová, H. Živná, K. Doubková, P. Živný, E. Čermáková, V. Palička

141

Effect of dyslipidaemic diets on bone status in male Wistar rats

P. Živný, H. Živná, I. Gradošová, K. Švejkovská, S. Hubená, V. Palička

148

Effect of metoprolol on bone metabolism in male Wistar rats after orchidectomy

I. Gradošová, H. Živná, P. Živný, S. Hubená, K. Švejkovská, V. Palička

153

INFORMATION

News from around the world

159

Cover page: Dual-Energy X-Ray Absorptiometry image of Wistar rat on Hologic Delphi densitometer [file image Iveta Gradošová, MSc.]

Vážené kolegyně a kolegové,

před Vámi je poslední číslo Osteologického bulletinu roku 2011. Není třeba zdůrazňovat, že získání kvalitních článků pro českojazyčný časopis bývá spojeno s nemalou námahou. Naprostá většina českých autorů preferuje zaslání svých rukopisů do impaktovaných periodik, nebo alespoň do časopisů, které jsou dohledatelné na PubMed/Medline. Je proto velice příjemným zjištěním, že řada českých a slovenských autorů má nadále zájem publikovat v domácím periodiku a že jsme dosud dokázali získat i příspěvky od některých významných zahraničních odborníků.

Osteologický bulletin byl od počátku zaměřen převážně na klinickou obec, a tudíž přinášel přehledné články, původní práce či kazuistiky, týkající se kostního a minerálního metabolismu. Mezinárodně uznávané časopisy s osteologickou tematikou (Journal of Bone and Mineral Research, Osteoporosis International, Bone, Calcified Tissue International, Journal of Bone and Mineral Metabolism) zveřejňují rovněž řadu zajímavých, leckdy průlomových prací ze základního výzkumu. Jedná se o experimentální práce s tkáňovými kulturami či laboratorními zvířaty, nejčastěji hloďavci. S potěšením konstatuji, že i Osteologický bulletin ob-

držel v roce 2011 několik textů týkajících se základního výzkumu, které po provedeném recenzním řízení rádi publikujeme. Jedná se o články **Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar, Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů, Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii, Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů** autorského kolektivu z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové pod vedením prof. MUDr. Vladimíra Paličky, CSc. a doc. MUDr. Pavla Živného, CSc. Pro Osteologický bulletin se tedy jedná o první (a budme přesvědčeni, že rozhodně nikoliv poslední) vlaštočky z oblasti základního výzkumu a experimentální medicíny. Přeji příjemné čtenářské zážitky a zejména pak krásný a úspěšný rok 2012.

Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.
zástupce šéfredaktora

Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu – souhrn poznatků

P. ŽIVNÝ¹, K. ŠVEJKOVSKÁ², I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ^{1,3}, V. PALIČKA¹

¹Osteocentrum, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové

²Centrum klinických studií (CCBR, a. s., Czech) v Pardubicích, ³Radioizotopové laboratoře a vivárium, LF UK v Hradci Králové

SOURHN

Živný P., Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Palička V.: **Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu**
Přehledný článek přináší souhrn současných názorů na studium biomechanických aspektů skeletální fragility v humánní a zejména v experimentální oblasti. V textu je popsána metoda testování mechanické odolnosti kosti v experimentu. Účelem testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu není simulovat nebo vysvětlit mechanismus vzniku fraktur u člověka, ale slouží výhradně pro testování změn fragility kostí pokusných zvířat za různých experimentálních podmínek.

Klíčová slova: fraktury, biomechanické vlastnosti, kost, skeletální fragilita

SUMMARY

Živný P., Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Palička V.: **Assessment of bone biomechanical properties in experimental research**
The review summarizes current opinions on biomechanical properties of bone and their study in humans as well as under experimental conditions. The method of experimental testing of bone biomechanical properties is described in this review. The purpose of experimental testing of bone biomechanical properties is not to explain the mechanisms of bone fractures in patients. It is intended exclusively for testing bone fragility in rats under various experimental conditions.

Keywords: fractures, biomechanical properties, bone, bone fragility

Osteologický bulletin 2011;16(4):132–136

Adresa: Doc. MUDr. Pavel Živný, Osteocentrum, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: zivny@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 27. 7. 2011

Přijato k tisku: 7. 12. 2011

Úvod

Současné možnosti hodnocení stavu mechanické odolnosti skeletu v klinických podmínkách jsou značně omezené. Na skelet působí během aktivity nepřehledné množství sil a zátěží, trvalých i nečekaných. Přes zdokonalující se zobrazovací metody, doplněné sofistikovaným softwarem je skutečná mechanická odolnost kosti stále jen odhadována, zejména na základě výsledků denzitometrických analýz (DEXA – dual energy X-ray absorptiometry s řadou doplňujících software a matematických modelů, nebo analýz založených na principech CT nebo MR – high-resolution micro-computed tomography, magnetic resonance imaging). Histologická analýza kostní tkáně má v tomto smyslu velmi omezenou výpovědní schopnost a vzorek je navíc zpravidla odebírán z míst, kde není skelet zatěžován. Schopnost kosti odolávat fraktuře (celková odolnost kosti) závisí na množství kosti (bone mass), na prostorovém uspořádání kostní hmoty (tvar a mikroarchitektura) [1,2,3] a na vlastních fyzikálních vlastnostech materiálu, ze kterého je kost tvořena [4].

Odolnost oblasti proximálního femuru u člověka

V humánních studiích jsou v oblasti proximálního femuru předmětem zájmu především „sideways falls“, tedy boč-

ní pády, které vedou k frakturám v oblasti proximálního femuru. Nedostatkem těchto studií je skutečnost, že jen 30 % dobrovolníků – zdravých mužů bylo schopno „upadnout“ přímo na bok na měkkou podložku (zíněnku), bez reflexního zmírnění pádu rukou nebo jiným svalovým úsilím, tak, aby mohly být sledovány rychlosti a síly působící na proximální femur. K takovýmto pokusům bývají užívány též kadavery nebo crash dummies [5]. Dále byla vyvinuta také řada matematických modelů a simulací [6,7].

Odolnost obratlových těl u člověka

Studium biomechanických vlastností obratlových těl *in vivo* je ještě problematictější. Jednoznačná definice vertebální fraktury zůstává kontroverzní [8] a také řada fraktur obratlových těl zůstává klinicky nerozpoznána. Obratlové fraktury však upozorňují na zvyšující se riziko dalších fraktur. Obratlové fraktury vznikají rovněž při pádech, zejména u mužů. Běžné denní aktivity vedou k významnému zatěžování páteře a zásadní otázkou je odlišit právě aktivity spojené s takovou zátěží obratlových těl, vedoucí k jejich poškození. Značnou roli zde však hrají i jiné faktory, zvedání a přenášení těžkých břemen v nevhodné poloze, např. na natažených horních končetinách nebo v předklonu. Značnou zátěží na obratlová těla je i zdánlivě nevýznamný pohyb, na-

př. zvedání ze židle bez pomoci rukou [9]. Měření biomechanické zátěže obratlových těl *in vivo* není možné, k nepřímému určení jsou však užívány kinematické analýzy, elektromyografická měření a biomechanické matematické modely [10].

Vlastnost kosti, její pevnost a elasticita souvisí tedy: A) s vlastností kostního materiálu – celkový objem kosti, stupeň mineralizace, podíl kolagenních a nekolagenních složek, podíl kortikální a trabekulární kosti; B) s geometrickými vlastnostmi – uspořádání krystalů a kolagenních vláken, tedy na uspořádání trabekulární sítě a kortikálních lamel [11].

Mechanické vlastnosti kosti zahrnují odolnost vůči tlaku, tahu a torzi, zahrnují tedy pevnost i elasticitu kosti. Pevnost kosti je dána stupněm mineralizace kosti, zatímco elasticita souvisí s organickou složkou kostní tkáně, její kvantitou a kvalitou.

Testování biomechanické odolnosti kostí *ex vivo*

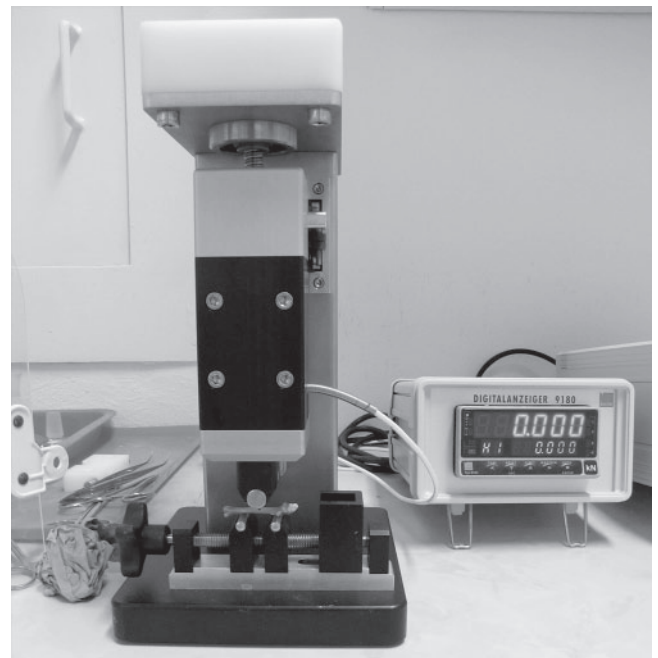
Mechanické vlastnosti kostní hmoty mohou být testovány, stejně jako se testují mechanické vlastnosti materiálů využívaných v mnoha různých odvětvích, např. stavebním, strojírenském nebo textilním průmyslu. Zde je však nutné zdůraznit, že materiály testované v průmyslu se zpravidla nevyznačují heterogenitou, kterou, jak vyplývá z textu výše, vykazuje kost (kostní tkáň). Takovéto testování materiálů je prováděno také v medicínské oblasti. Využívá se jednak při sledování vlastností vyráběných náhrad (kloubů, stentů, chlopní), ale i při sledování změn mechanických vlastností svalů, šlach a kostí.

U zvířecích modelů, kdy nejčastěji používaným experimentálním zvířetem je potkan, se testování provádí *ex vivo* na celé kosti (femur, tibie, humerus, radius), u větších zvířat pak lze použít např. také metatarzální kůstky, mandibuly nebo na části kostí. Vyhodnocení části kortikální nebo trabekulární kosti, upravené do specifických geometrických tvarů, je používáno nejen u lidských vzorků, kde jiný způsob testování není možný [12], ale i pro vzorky získané z pokusných zvířat [13].

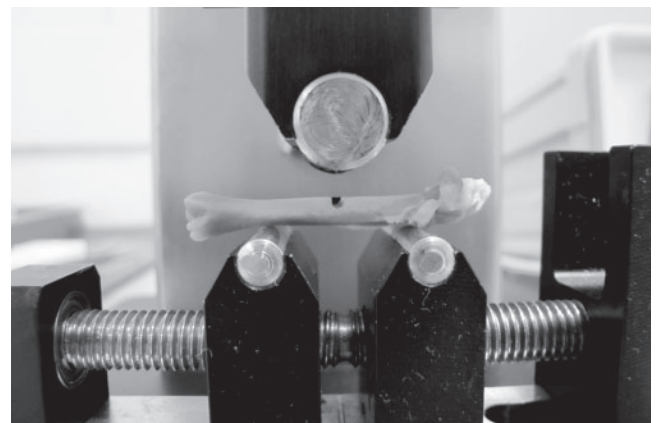
K testování mechanické odolnosti kostí jsou používány komerčně dostupné přístroje, bohužel s velmi vysokou pořizovací cenou, např. Instron, MAY 03, USA [14], Shenk-Trebel model RTP 0.6 [15], Avalon Technologies, USA [16,17], MZ500D, Maruto Co, Japonsko [18], LR5K J. Lloyd Instruments, UK [17], 145660 Z020/TND, Zwick/Roell, Německo [19]. Tyto přístroje umožňují validaci procesu testování, určení pružnosti kosti a odhad zastoupení kompaktní a spongiózní kosti. Řada autorů využívá tzv. „custom-made material testing machine“ [13,21]. Konstrukce všech těchto přístrojů vycházejí z práce Penga a spol. [22]. Tyto „na zakázku“ vyrobené přístroje nemají zpravidla software, který by umožňoval kalkulovat s parametry pružnosti, vzdorování kosti v torzi atd., ale umožňují určení síly, při které dochází k fraktuře testované kosti (jak bude popsáno níže). Těmto faktům je nutné přizpůsobit design studií tak, aby byly získány odpovědi na položené otázky. Přístroj, který jsme používali my, byl vyroben firmou Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika.

Odolnost kosti v tlaku testujeme vertikálním působením síly na kost, provádí se kompresní test krčku femuru nebo

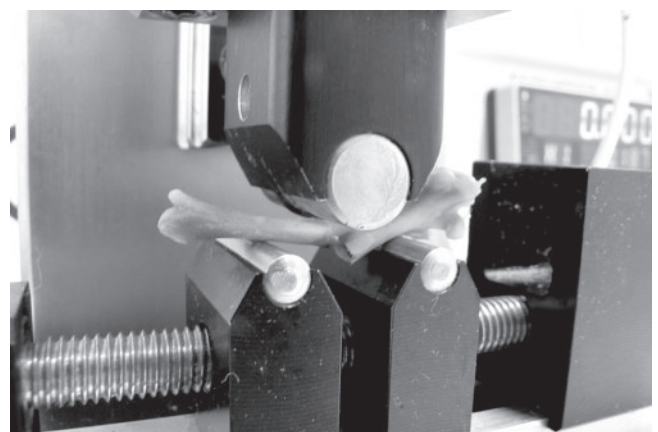
Obr. 1
Celkový pohled na přístroj na třibodové lámání,
v pravo snímací jednotka



Obr. 2
Připravený femur k třibodovému lámání



Obr. 3
Femur po zlomení třibodovým testem



obratle, dále metodou tří- až čtyřbodovým ohýbáním u dlouhých kostí, jako je femur, humerus, tibiae.

Nejčastěji používaná je metoda tříbodového ohýbání kosti (three-point bending). Tuto metodu lze provádět jen na dlouhé kosti, na kterou je vyvíjen bočný tlak. Je možné testovat odolnost střední části diafýzy femuru, ale i distální části femuru, nebo proximální části tibiae [17]. Testovaná kost se umístí na dvě podpěry vzdálené od sebe na určitou vzdálenost, třetí, vrchní čepel, působí kolmo na střed lámané kosti. Přístroj zaznamenává narůstající tlakovou sílu. V momentě zlomení kosti, kdy na čidlo přestane působit tlak, se zobrazí na displeji hodnota maximální síly, která vedla ke zlomení kosti. Modernější přístroje zaznamenávají kromě maximální síly působící na kost před zlomením také tvrdost a absorpci energie v tzv. křivce zátěžového posunutí (zátěžově-deformační křivka) [11]. U našeho přístroje by bylo možné ještě zaznamenávat hodnoty narůstajícího tlaku naměřené čidlem před zlomením kosti. Tím bychom se mohli vyjádřit i k určitému stupni elasticity lámané kosti. Plánujeme tuto možnost u našeho přístroje technicky dořešit.

Čtyřbodové ohýbání se liší tím, že seshora působí místo jedné čepelce dvě. Komplikací této metody ve srovnání s tříbodovým ohýbáním je podmínka, aby se obě čepelce dotkly kosti ve stejný okamžik. Dalším méně používaným typem testování odolnosti kosti je použití konzoly, kdy se jeden ko-

nec kosti zafixuje pomocí pryskyřice a síla působí na volný, nepodepřený konec. Kost je orientována tak, aby napodobovala pozici kosti *in vivo*, tímto způsobem je částečně eliminována nutnost exaktního umístění a natočení kosti při tří- nebo čtyřbodovém lámání [23]. Před samotným testováním je nutné kost důkladně očistit od měkkých tkání. Odstraňování měkkých tkání je nutné provádět opatrně, aby nedošlo k poškození povrchu kosti, a tím ke zkreslení výsledků testování. Dále je potřeba zabránit vysychání kostní tkáně po dobu testování, např. zabalením do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem.

Co se týká samotného přístroje, je potřeba zajistit, aby podpěry byly hladké se zaoblenými hranami, aby se zabránilo „hromadění“ tlaku a zařezávání podpěry do kosti. Důležitost kontaktu čepelí s kostí ve stejný čas u čtyřbodového lámání byla již zmíněna, což je obtížně proveditelné vzhledem k nepravidelným tvarům kostí. Částečně se tomu můžeme vyhnout, bude-li vzdálenost mezi podpěrami co nejmenší. Dalším velkým zdrojem chyb je již zmíněný nepravidelný tvar kosti. Někteří autoři tvrdí, že vzdálenost spodních podpěr by měla být pro samice potkanů 15 mm a pro samce 20 mm, aby se zajistilo, že z 58–90 % bude deformace způsobena ohýbáním. Není-li splněna tato podmínka, zapojuje se také smyková deformace. Další možností nastavení vzdálenosti spodních podpěr je dle Leppänen a spolupracovníků [24] možné tak, aby jedna podpěra byla pod velkým trochanterem (trochanter major) a druhá pod distálním koncem femuru. Někteří autoři používali konstantní vzdálenost mezi spodními podpěrami v závislosti na velikosti kostí, které byly testovány, např. 10 mm [17] nebo 15 mm [18,25].

Další otázkou zůstává, v jakém směru kost testovat. U femuru potkana se z anatomických a především praktických důvodů dává přednost testování v předozadním směru (antero-posteriorním, AP) [21,26]. Ovšem dle jiných autorů vzhledem k funkční adaptaci kosti na zátěž, je vhodnějším směrem testování středo-boční (medio-laterální, ML). Femur má v tomto směru největší eliptický průměr diafýzy a představuje zřejmě primární směr adaptace kosti na zátěž [24,27]. Při testování v mediolaterálním směru je ale nutné zabránit otáčení femuru na anatomicky přijatelnější anteroposteriorní stranu uchycením interkondylární části do speciálního fixačního zařízení. Již samotným uchycením kosti může dojít k ovlivnění jejích mechanických vlastností [24].

Před vlastním lámáním je testovaná kost zatížena malým stabilizujícím tlakem do 10 N, nebo např. 0,5 N [25], 1 N [20], 10 N [19]. Stabilizující tlak se aplikuje na kost zejména proto, aby se zafixovala a nedošlo k jejímu protáčení.

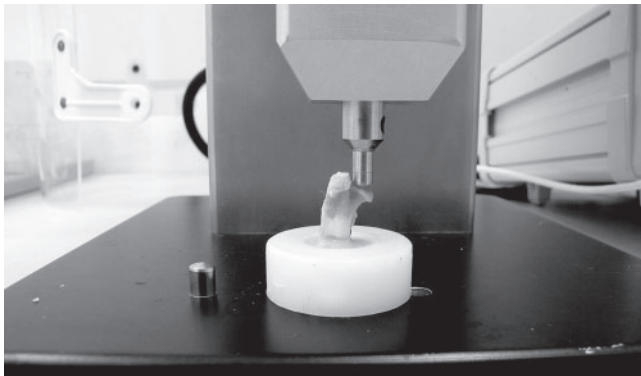
Většina testů probíhá za pokojové teploty, ale např. Iwamoto a spolupracovníci testovali tříbodové ohýbání u femurů potkanů Sprague-Dawley po třech minutách v solné lázni při teplotě 37 °C [18].

Ohýbací síla může být aplikována různou rychlostí: 50 mm/s [20], 1 mm/s [24,26], 0,5 mm/s [17], 0,155 mm/s [21], 0,1 mm/s [19], 20 mm/min [25,18], 5 mm/min [28], 2 mm/min [29].

Dalším způsobem zlomení kosti, se kterým se v klinické praxi často setkáváme, je torzní zlomení kosti, např. spirální zlomeniny bérce. V experimentu je analogií torzní test,

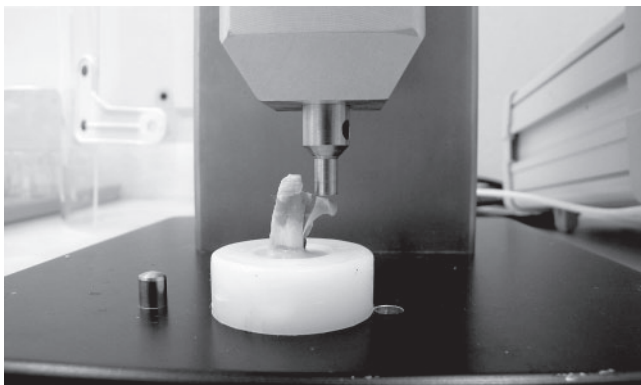
Obr. 4

Nastavení přístroje ke zlomení krčku femuru



Obr. 5

Krček femuru po jeho ulomení



který dává informaci o smykovém napětí před samotným zlomením. Pro tento test se kromě celých kostí mohou také používat části kostí upravené do specifických tvarů. Test může být prováděn na všech typech kostí a v různých orientacích. Konce kostí jsou před uchycením upraveny abrazivním materiálem. Tím se zlepší přichycení polymethylmetakrylátu, do kterého jsou kosti fixovány, a teprve takto upravené konce jsou sevřeny do upevňovacího zařízení. Zabrání se tím drčení konců kostí při testování. Je třeba, aby délka kosti, která je vystavena torzi, byla vždy konstantní. Úhlová rychlost otáčení je volitelná, ale opět vždy v jednom experimentu standardní: 4,8 °/s [31], 4 °/s [14], 6 °/s [11], 10 °/min [15]. Zaznamenává se torzní síla potřebná ke zlomení kosti (Nm), přičemž některé přístroje zaznamenávají také úhel zlomení (rad; °). Další parametry, jako je mezní torzní síla, tuhost, smykový tlak a smykový modul se musejí ze základních hodnot vypočítat. Testování odolnosti kosti v torzi je metoda používaná již od 70. let 20. století [32, 33,34].

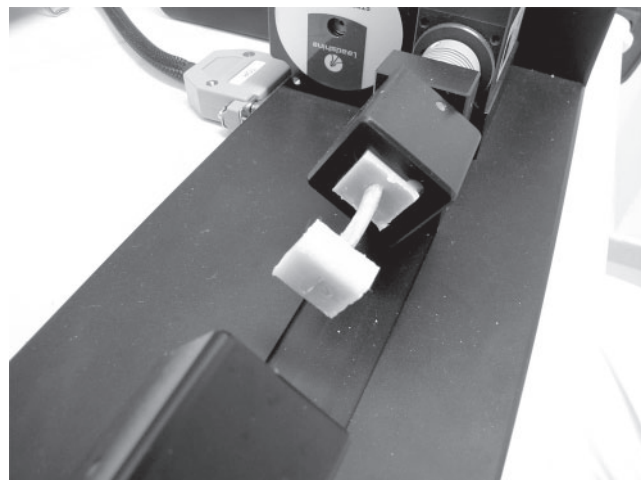
Dalším testem, poměrně hojně používaným k hodnocení mechanických vlastností kostí u potkanů, je kompresní test. Kompresi jsou nejčastěji vystavovány těla obratlů a krčky femurů. Opět lze v experimentu použít jak celé kosti, tak jen jejich části. Tato metoda je náročnější na přípravu vzorku. Kromě již výše zmíněného dokonalého očištění kosti je potřeba testovaný vzorek uchytit ve speciálním fixačním zařízení, aby se zabránilo pohybu vzorku. K tomuto ukotvení se nejčastěji používají polyakrylamidové pryskyřice. Při testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku je potřeba celý femur, nebo jeho proximální část (získanou po tříbodovém lámání), upevnit kolmo k podložce. Hlavice femuru se opět zatíží malým stabilizačním napětím do 10 N, a poté se zahájí test, kdy síla je aplikována na kost v podélné ose. Vrchní čepel tlačí na hlavici femuru až do zlomení krčku femuru nebo do rozdrčení obratle. Rychlost stlačování je opět volitelná: 0,155 mm/s [21,17], 1 mm/s [24,26], 2 mm/min [29,30], 6 mm/min [35].

Vedle kompresního testu se používá k hodnocení mechanických vlastností kostí také tahový test. Tento test je častěji používán při testování elastických materiálů, jako jsou svaly a šlachy, ale používá se např. i u dlouhých kostí. Kost se zafixuje pomocí polyakrylamidové pryskyřice na obou koncích a následně upevní horizontálně v upevňovacím zařízení. Vzdálenost mezi konci upevňovacího zařízení je volitelná, např. 3 mm. Testované kosti jsou opět vystaveny malým počátečním napětím (5–10 N). Během upevňování kosti i během samotného testování musí být kost udržována vlhká. Rychlost tahové zátěže může být 2 mm/min, nebo 1 mm/s [14]. Maximální zatížení představuje maximální tahovou sílu vyvinutou těsně před vznikem zlomeniny. Hodnoty intenzity tahu před zlomením kosti můžeme vynést do křivky. Sklon lineární části křivky zátěžového posunutí definuje tvrdost a plocha pod touto křivkou definuje energetickou absorpční kapacitu. Z křivky tlak-pevnost je možné určit mezní tlak, mezní pevnost a modul pružnosti [14].

Popisované typy ohýbání a lámání kostí bývají užívány v experimentech většinou společně (často v závislosti na množství dostupného materiálu), protože často nelze predikovat, jakým způsobem bude pevnost kosti narušena, není

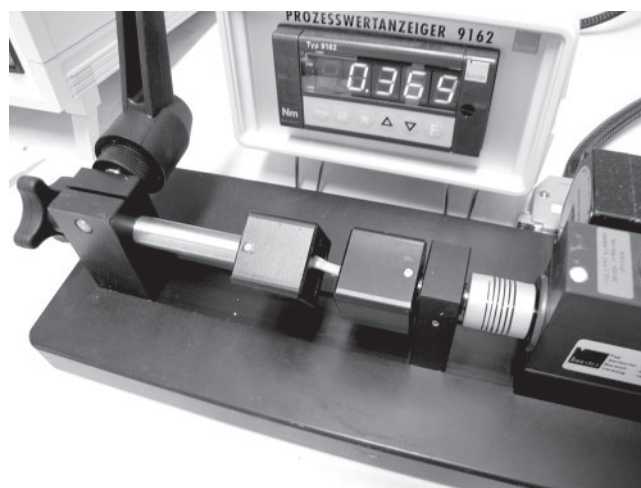
Obr. 6

Fixace femuru se zatavenými konci v polyakrylamidové hmotě v torzním přístroji



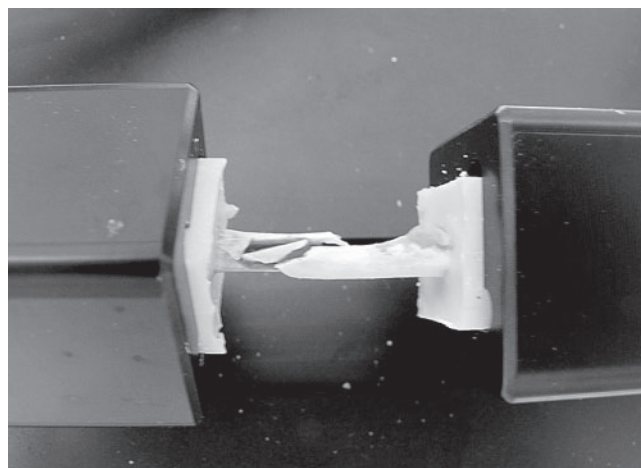
Obr. 7

Probíhající test torzního zlomení femuru se snímací jednotkou v pozadí



Obr. 8

Femur po testu zlomení torzní silou



možné říci, že některá z metod má jednoznačné výhody nebo nevýhody.

Závěr

V článku jsou shrnuty dosavadní zkušenosti experimentální skupiny v oblasti biomechanického testování kosti v experimentech na potkanech. Jde o stručný popis metod testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu metodami tříbodového nebo čtyřbodového ohýbání kosti, torzního zlomení kosti a kompresním testem. Za pomoci těchto metod lze získat představu o biomechanické odolnosti kosti a jejich změnách při působení zejména léků nebo stopových prvků, na jejichž studium je nyní experimentální skupina zaměřena.

Je zřejmé, že bude nutné vypracovat ještě další metodické postupy na testování mechanické odolnosti obratlových těl.

Ve spolupráci s tvůrci přístroje by bylo vhodné ještě zaznamenávat jednotlivé hodnoty tlaku, naměřené čidlem před definitivním zlomením kosti. Tím bychom se mohli vyjádřit i k dalším mechanickým vlastnostem kostí a postupně doplnit i o matematické zpracování výsledků, které zatím vzhledem k omezenému počtu zaznamenávaných údajů chybí.

Je nutné zdůraznit, že účelem testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu není simulovat nebo vysvětlit mechanismus vzniku fraktur u člověka. V experimentech nejsou tedy respektovány tlaky (síly), které působí např. na obratlová těla u člověka (vertikálně), zatímco páteř, a tedy i obratlová těla u potkana, jsou horizontálně. Získané výsledky slouží výhradně pro testování změn biomechanických vlastností kostí, ovlivněných různými experimentálními podmínkami, především dlouhodobě podávanými dietami nebo léky. Do klinické praxe pak mohou být s patřičnou opatrností přenášeny pouze získané poznatky o vlivu zkoumaných látek (zejména léků) na kostní tkáň a v klinické praxi je možné se zaměřit např. na léky, které v experimentu prokázaly negativní vliv na biomechanické vlastnosti kosti.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura

- Rice JC, Covin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomechanics* 1988;21:155–168.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14:595–608.
- Hanus D, Censky T, Anderle P, Ruzicka P et al. Experimental Research of 3D Flow Fields within Curved Channels. In CTU Reports Proceedings of Workshop 2002, 11–13 February 2002 Prague; Volume B. Prague: Czech Technical University in Prague, pp 676–677. ISBN 80-01-02511-X.
- Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng* 2001;3:307–333.
- Currey JD. What determines the bending strength of compact bone? *J Exp Biol* 1999; 202: 2495–2503.
- Bouxsein M. Determinants of skeletal fragility. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:897–911.
- Bouxsein M. Biomechanics of age-related fractures. In: Marcus R, Feldman D, Nelson D, Rosen C. (eds.) *Osteoporosis*. Third Edition, San Diego, CA: Elsevier Academic Press 2007;601–616.
- van den Kroonenberg AJ, Hayes WC, McMahon TA. Hip impact velocities and body configurations for voluntary falls from standing height. *J Biomech* 1996; 29:807–811.
- Cooper C, Atkinson E, O'Fallon W, Melton L. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985–1989. *J Bone Miner Res* 1992;7:221–227.
- Adams MA, Dolan, P. Spine biomechanics. *J Biomech* 2005;38:1972–1983.
- Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol* 2007;26:380–384.
- Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 2001;19:1021–1026.
- Lepola VT, Hannuniemi R, Kippo K, Lauriäään L et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. *Bone* 1996;18:191–196.
- Comelekoglu U, Mutlu H, Yalin S, Bagis S et al. Determining the biomechanical quality of normal and osteoporotic bones in rat femora through biomechanical test and finite element analysis. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:53–57.
- Moro-Alvarez MJ, Díaz Curiel M, de la Piedra C, Mariño ML et al. Bone disease induced by phenytoin therapy: clinical and experimental study. *Eur Neurol* 2009;62:219–230.
- Lind PM, Larsson S, Johansson S, Melhus H et al. Bone tissue composition, dimensions and strength in female rats given an increased dietary level of vitamin A or exposed to 3,3 %, 4,4 %, 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) alone or in combination with vitamin C. *Toxicology* 2000;151:11–23.
- Herlin M, Kalantari F, Stern N, Sand S et al. Quantitative characterization of changes in bone geometry, mineral density and biomechanical properties in two rat strains with different Ah-receptor structures after long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 2010;273:1–11.
- Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y et al. Comparative therapeutic effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and mechanical properties in ovariectomized osteopenic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006;52:1–8.
- Leppänen OV, Sievänen H, Järvinen TL. Biomechanical testing in experimental bone interventions-may the power be with you. *J Biomech* 2008;4:1623–1631.
- Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Schmisch S, Rack T et al. Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 2006;21:89–96.
- Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK et al. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998;23:155–161.
- Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone* 1994;15:523–532.
- McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 2008;26:384–393.
- Leppänen O, Sievänen H, Jokihaara J, Pajamäki I et al. Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *J Bone Miner Res* 2006;21:1231–1237.
- Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R et al. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone* 2006;38:136–144.
- Järvinen TL, Sievänen H, Kannus P, Järvinen M. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in predicting mechanical characteristics of rat femur. *Bone* 1998; 22:551–558.
- Leppänen OV, Sievänen H, Jokihaara J, Pajamäki I et al. The effects of loading and estrogen on rat bone growth. *J Appl Physiol* 2010;108:1737–1744.
- Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26:130–137.
- Brzóška MM, Majewska K, Moniuszko- Jakoniuk J. Mineral status and mechanical properties of lumbar spine of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Bone* 2004;34:517–526.
- Brzóška MM, Galażyn-Sidorczuk M, Rogalska J, Roszczenko A et al. Beneficial effect of zinc supplementation on biomechanical properties of femoral distal end and femoral diaphysis of male rats chronically exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 2008;171:312–324.
- Nazarian A, Entezari V, Vartanians V, Muller R et al. An improved method to assess torsional properties of rodent long bones. *J Biomech* 2009;42:1720–1725.
- Strömberg L, Dalén N. Experimental measurement of maximum torque capacity of long bones. *Acta Orthop Scand* 1976;47:257–263.
- Mattila P, Knuutila M, Kovanen V, Svanberg M. Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration. *Calcif Tissue Int* 1999;64: 340–344.
- Lepola VT, Väänänen HK, Jalovaara P. The effect of immobilization on the torsional strength of the rat tibia. *Clin Orthop Relat Res* 1993;297:55–61.
- Brzóška MM, Majewska K, Moniuszko-Jakoniuk J. Mechanical properties of femoral diaphysis and femoral neck of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Calcif Tissue Int* 2005;76:287–298.

Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů

H. ŽIVNÁ¹, P. ŽIVNÝ², I. GRADOŠOVÁ², K. ŠVEJKOVSKÁ¹, S. HUBENÁ²,
O. ŽIVNÝ¹, V. PALIČKA²

¹Radioizotopové laboratoře a vivárium, UK Praha, LF v Hradci Králové,

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové, ³CCBR Czech, a. s., Pardubice

SOUHRN

Živná H., Živný P., Gradošová I., Švejková K., Hubená S., Živný O., Palička V.: **Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů**

Cíl: Cílem studie bylo sledovat vliv operačního zákroku na metabolismus a fyzikální stav kostí.

Materiál a metody: Samci potkanů kmene Wistar byli náhodně rozděleni do dvou skupin po 6 zvířatech s počáteční hmotností 373 ± 6 g. Byli živeni standardní laboratorní dietou a pitnou vodou *ad libitum*. Skupina KON: intaktní; skupina OPE: potkani 18 hodin po břišní operaci – částečné hepatektomii. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty. V séru jsme stanovili triacylglycerol (mmol/l), leptin (pg/ml), glukózy (mmol/l) a inzulín (ng/ml). Poté *post mortem* jsme změřili denzitu kostního minerálu (BMD; g/cm²). V homogenátu kosti (150 mg tkáň/1,5 ml fosfátového pufru) jsme stanovili markery kostního obratu: osteokalcin (OC), prokolagen I N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA (μg/l). Femury byly kontrolovaně zlomeny třibodově ve středu diafýzy a v oblasti krčku femuru.

Výsledky: U potkanů nebyly prokázány rozdíly mezi kontrolní a experimentální skupinou v BMD (páteř p = 0,623; ocas p = 0,120; femur p = 0,143), ani v tloušťce femuru, ani mezi silami nezbytnými ke zlomení diafýzy (p = 0,171) i krčku femuru (p = 0,644). Po operačním zákroku došlo k poklesu triglyceridémie (p < 0,001) a k vzestupu glykémie (p < 0,001). V homogenátu kostí po operaci byl zvýšen osteokalcin (p = 0,033) a naopak snížen PINP (p = 0,031) a CTX (p = 0,010).

Závěry: Naše výsledky ukazují, že abdominální chirurgický zákrok po velmi krátkém čase není schopen ovlivnit denzitu kostního minerálu a biomechanické vlastnosti kosti (odolnost k fraktuře), ale je ovlivněn kostní metabolický obrat pravděpodobně pooperační imobilitou, stresem a změnami v příjmu potravy.

Klíčová slova: kost, minerální denzita, metabolický obrat, fraktura, operační zákrok, potkan

SUMMARY

Živná H., Živný P., Gradošová I., Švejková K., Hubená S., Živný O., Palička V.: **The influence of abdominal surgery (partial hepatectomy) on bone status in male Wistar rats**

Aim: The aim of the study was to assess the influence of abdominal surgery (partial hepatectomy) on bone metabolic turnover and bone biomechanical properties.

Methods: Male Wistar rats were divided into 2 groups (6 rats in each group, body weight 373 ± 6 g). The rats were fed with standard diet and tap water *ad libitum*. Intact rats were in the control group (KON). The other group (OPE) comprised rats 18 hours after abdominal surgery (partial hepatectomy). The rats were sacrificed by exsanguination from the abdominal aortic bifurcation. Concentrations of triglycerides (mmol/L), leptin (pg/mL), glucose (mmol/L) and insulin (ng/mL) were estimated in sera. Then *post mortem* bone mineral density (BMD) was measured with dual energy X-ray absorptiometry (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA). The proximal caudal vertebrae and femurs were extracted from the animals and broken in a controlled manner using a biomechanical testing device (Martin Kosek & Pavel Trnecka, Hradec Kralove, Czech Republic). Bone homogenate was analyzed for osteocalcin, pro-collagen type I N-terminal propeptide (PINP) and carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) by EIA (pg/mL).

Results: There were no significant differences between the KON and OPE groups in BMD (spine p=0.623; tail p = 0.120; femur p = 0.143), as well as in femur size (thickness) and strength needed for femur diaphysis (p = 0.171) and neck fracture (p = 0.644). Triglyceride levels were decreased (p < 0.001) and glucose levels increased (p < 0.001) in the OPE group. Osteocalcin levels (p = 0.033) in bone homogenate were increased, but PINP and CTX levels were decreased (p = 0.031; p = 0.010) in the OPE group.

Conclusions: The findings suggest that abdominal surgery in extremely short time is not able to influence BMD and bone biomechanical properties. However, bone metabolic turnover is influenced, presumably by immobility, stress and changes in food consumption.

Keywords: bone, mineral density, metabolic turnover, fracture, surgery, rat

Osteologický bulletin 2011;16(4):137–140

Adresa: Doc. MUDr. Helena Živná, CSc., UK v Praze, LF v Hradci Králové, Radioizotopové laboratoře a vivárium, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, e-mail: zivna@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 1. 11. 2011

Přijato k tisku: 30. 12. 2011

Úvod

V běžné lékařské praxi je nutné provádět chirurgické zákroky, po kterých nastává stresová reakce organismu na operační zákrok. Vliv jaterního poškození na vznik osteoporózy a na riziko fraktur je znám, jedná se ale o chronický, dlouho se vyvíjející stav, například pacienti s primární biliární cirhózou mají zvýšené riziko zlomenin [1], dále též pacienti s hemochromatózou nebo alkoholickým poškozením jater [2]. Jaterní osteodystrofie je metabolické kostní onemocnění, vyskytující se ve spojitosti s chronickým jaterním onemocněním. Dochází k vývoji stavu, kdy se jedná o kombinaci osteoporózy s osteomalácií.

Zajímalo nás, jestli i jeden akutní zásah do organismu, operace s odstraněním části jaterní tkáně, se bude odrážet ve změněném metabolismu kostní tkáně.

V kostech a zubovíně se nalézá nekolagenní bílkovina osteokalcin, která je produkována osteoblasty za přítomnosti vitamínu K. Proto bývají koncentrace osteokalcinu využívány jako ukazatel, stanovující intenzitu kostní formace aktivními osteoblasty [3]. Bylo dokonce prokázáno, že vysoké sérové koncentrace osteokalcinu relativně velmi dobře korelují s nárůstem hustoty kostního minerálu, tzv. BMD (Bone Mineral Density), stejně tak s mechanickou stimulací [4], kdy v extracelulární hmotě pod proliferujícími buňkami se

prokazuje osteokalcin, což ukazuje na aktivní kostní formaci [5].

N-terminalní propeptid kolagenu typu I (PINP) je ukazatelem intenzity metabolismu kolagenu před jeho zabudováním do kostní tkáně, čímž opět vypovídá o kostní matrix. C-terminalní crosslinking telopeptid kolagenu typu I (CTX) se naopak uvolňuje proteolytickými procesy z kolagenu typu I při jeho odbourávání, a je tedy citlivým ukazatelem kostní resorpce [6].

Položili jsme si otázku, jestli na jednorázový chirurgický výkon neodpovídá i kostní tkáň, se kterou jsou spojovány spíše představy velice pomalých odpovědí. Sledovali jsme jak změny kostní minerální hustoty a biomechanických vlastností kostí, tak i lokální ukazatele kostního metabolického obratu: osteokalcin, PINP a CTX.

Materiál a metodiky

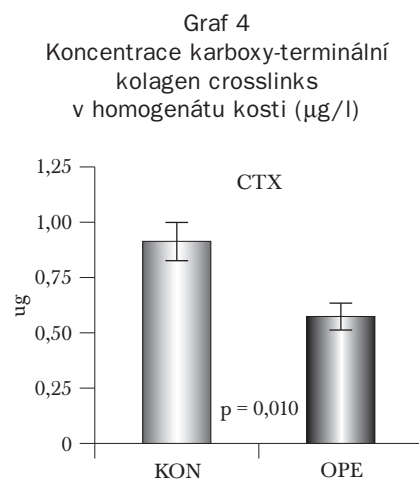
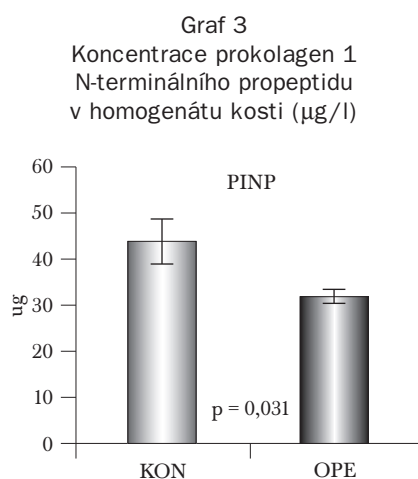
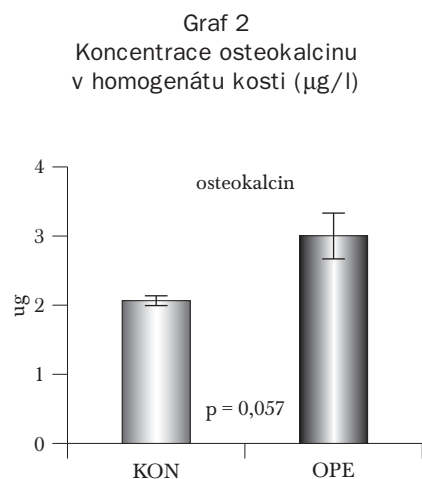
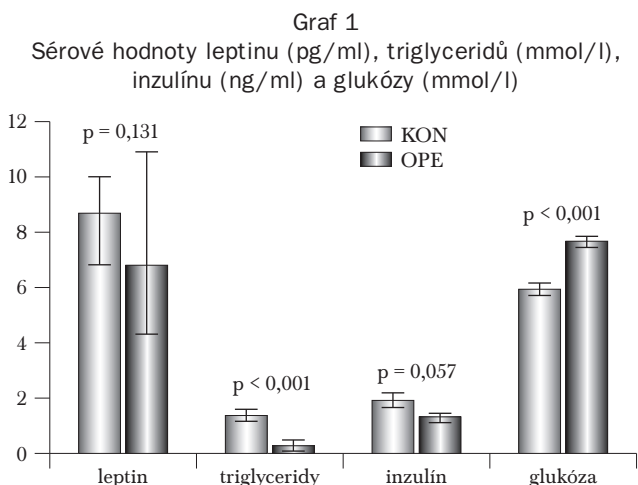
Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK HK). Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové (č.j. 3545/2006-30/300 a 8593/2008-30). Byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR), kteří byli rozděleni do dvou skupin po 6 zvířatech. Potkani byli umístěni v plastových klecích a chováni za standardních podmínek, živěni standardní laboratorní dietou a pitnou vodou *ad libitum*.

Skupina KON: intaktní; skupina OPE: potkani 18 hodin po břišní operaci – částečné hepatektomii. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v celkové anestezii parami éteru ve funkční digestoři.

V séru byly stanoveny koncentrace triacylglycerolu (mmol/l), dále leptinu (pg/ml), glukózy (mmol/l) a inzulínu (ng/ml).

Poté *post mortem* byla u potkanů změřena BMD (g/cm²) dvouenergií absorpční spektrofotometrií v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. BMD v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného programu (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA).

Následně byly vyňaty z potkanů ocasní obratle a pravé femury. S využitím homogenizačního přístroje MagNA Lyser



instrument (Roche Applied Science, Německo) jsme homogenizovali části ocasních obratlů (150 mg tkáň/1,5 ml fosfátového pufru). V získaném supernatantu kostního homogenátu jsme stanovili koncentrace markerů kostního obratu – osteokalcin (OC), prokolagen 1 N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA ($\mu\text{g/l}$; Usncilife Sciences & Technology Co., Ltd., Čína).

Femury byly kontrolovaně zlomeny v testovacím přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové) třibodově ve středu diafýzy a v oblasti krčku femuru tlakem na hlavici. O metodice bylo již dříve referováno [7].

Statistická analýza byla provedena s využitím software "SigmaStat 3.1" Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Metodami One Way Anova, Holm-Sidak Metod. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba nebo jako medián (a percentily 25%–75%), hodnoty statistické významnosti jsou uvedeny v tabulkách i grafech.

Výsledky

U potkanů nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v BMD mezi sledovanými skupinami (tab. 1).

Rozdíly v délce femuru ani jeho tloušťce ve středu diafýzy nebyly statisticky významné. Vyhodnocením síly nutné ke zlomení diafýzy i krčku femuru jsme nenalezli žádné statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami (tab. 2).

Sérové koncentrace leptinu před operačním zákrokem a po něm nebyly statisticky významné.

Po operačním zákroku došlo za 18 hodin k významnému poklesu triglyceridémie. Za 18 hodin po provedení částečné hepatektomie byl zjištěn v séru nevýznamný pokles koncentrací inzulínu, provázený statisticky významným vzestupem glykémie (graf 1).

Ke statisticky významnému vzestupu osteokalcinu v homogenátu kostní tkáň došlo za 18 hodin po operačním zákroku (graf 2).

Za 18 hodin po částečné hepatektomii jsme v homogenátu kostní tkáň zjistili statisticky významný pokles koncentrací PINP (graf 3).

V homogenátu kostní tkáň získaném za 18 hodin po provedení částečné hepatektomie jsme prokázali pokles koncentrací CTX (graf 4).

Diskuze

V úvodu jsme si položili otázku, zda na jednorázový chirurgický výkon odpovídá i kostní tkáň, se kterou jsou spojovány spíše představy velice pomalých odpovědí.

Po akutním operačním zásahu do organismu neočekáváme některé změny, které se nejspíše vyvíjejí delší čas. Přesto jsme po operačním zákroku u potkanů sledovali denzitometrické vyšetření kostí i změny biomechanických vlastností kostí. Spíše jsme očekávali diskrétní změny vybraných

ukazatelů kostního obratu, které jsme stanovili v homogenátu kostní tkáň: osteokalcin, PINP a CTX. Dali jsme přednost jejich stanovení v kostní tkáni před stanovením v séru. Předpokládáme, že budou přesněji odrážet děje v kostní tkáni než sérové hodnoty.

Po operačním zákroku potkani omezili svůj pohyb, spali schoulení a zjevení, spotřeba diety klesla přibližně na třetinu (23 g vs. 7 g diety na jednoho potkana a den). Jedná se tedy o komplexní reakci potkana na stres, jako je bolest, ztráta části jaterní tkáň, omezený příjem potravy. Tento stav netrvá déle než 24 hodin po operaci, potkan se začíná zotavovat, vymizí zjevení srsti a antalgické postavení těla. Je zahájeno stadium reparace a potkan se vrací k běžné pohybové aktivitě s příjmem plné dávky krmné diety.

Při sledování metabolických ukazatelů za 18 hodin po operaci jsme našli statisticky významný vzestup glykémie, což může být navozeno stresem [8], vyplavením kortikoidů, ale též poklesem hladin inzulínu, i když v tomto experimentu statisticky nevýznamným. Dále jsme zjistili významný pokles triglyceridémie, což nejspíše bylo v důsledku zahájení jaterní regenerace, kdy jsou tuky z periferie transportovány do jaterní tkáň [9].

Nevýznamné změny sérového leptinu svědčí o faktu, že pooperační snížení příjmu potravy není zprostředkováno leptinem, přestože údaje z literatury hovoří o jeho vlivu. Například Patterson-Buckendahl se spoluautory prokázali, že chronická imobilizace vedla k poklesu leptinu [10]. Role leptinu je ve svém vlivu na kostní tkáň nejednoznačná. Samotný leptin je schopen stimulovat osteoblasty a inhibovat osteoklasty, ale svými centrálními účinky přes sympatické neurony hypothalamu navozuje opačné děje v kostních buňkách [11]. Děje komplikuje antagonist leptinu – neuropeptid Y, který lokálně tlumí osteoblasty a zároveň snižuje koncentrace osteokalcinu [12].

U potkanů 18 hodin po operačním zákroku jsme neprokázali rozdíly v BMD mezi sledovanými skupinami. Je zná-

Tabulka 1
DEXA u potkanů na konci pokusu (g/cm^2)

	R1 – páteř	R2 – ocas	R3 – femur
KON	0,207 \pm 0,006	0,181 \pm 0,002	0,160 \pm 0,005
OPE	0,193 \pm 0,003	0,195 \pm 0,008	0,175 \pm 0,008
Stat. význ.	P = 0,623	P = 0,120	P = 0,143

Tabulka 2
Délka a průměr pravého femuru (mm). Síly nutné ke zlomení diafýzy a krčku femuru (N)

	Délka (mm)	Průměr (mm) zlomení (N)	Síla 3B krčku (N)	Síla zlomení
KON	34,24 \pm 0,32	3,18 \pm 0,04	149 \pm 7	129 \pm 8
OPE	34,43 \pm 0,5	3,16 \pm 0,08	152 \pm 10	134 \pm 12
Stat. význ.	P = 0,682	P = 0,266	P = 0,171	P = 0,644

mo, že fyzická aktivita má pozitivní vliv na BMD [13], ale v našem experimentu se jednalo o krátkodobé omezení pohybu po operaci, které se nemohlo na výsledcích BMD odrazit. Burkovskaya se spoluautory prokázali vliv na BMD u myši teprve po 3 týdnech imobilizace provázené progresivní demineralizací kostí [14]. Pokles BMD u lidí byl prokázán též po cévní mozkové příhodě, ale až po roce od začátku onemocnění a koreloval s tíží počátečního stupně parézy [15].

Biomechanické vlastnosti femurů nebyly ovlivněny 18 hodin po operačním zákroku. Změny biomechanických vlastností kostí – stresové fraktury – byly nalézány i u mladých lidí, velmi fyzicky aktivních. Toto zvýšené riziko ke stresovým frakturám se týkalo spíše těch, kteří po cvičení měli vyšší pokles tělesné hmotnosti, měli nižší celkové BMD a byli signifikantně nižšího vzrůstu [16].

Z literatury je známo, že vzestup sérového osteokalcinu ukazuje na aktivitu osteoblastů a kostní novotvorbu [17], jako jsou například stavy několika dnů po fraktuře kosti [18]. Ke statisticky významnému vzestupu osteokalcinu v homogenátu kostní tkáně došlo za 18 hodin po operačním zákroku, naopak pokles osteokalcinu prokázali Patterson-Buckendahl se spoluautory po stresovém podnětu – imobilizaci [10]. Pokles osteokalcinu v pooperační fázi 24 hodin po břišní operaci u lidí našel také Napal se spoluautory [19]. Můžeme se domnívat, že diskrepance výsledků může být způsobena místem, ze kterého byl osteokalcin izolován. V našem experimentu jsme ho získali přímo z kostní tkáně, dále mohla být snížena jeho clearance ztrátou jaterní tkáně.

Je známo, že s rostoucí fyzickou aktivitou roste kostní metabolismus, tj. osteokalcin, karboxyterminální propeptid prokolagenu typu I (PICP) a karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I (ICTP) [13]. Za 18 hodin po částečné hepatektomii jsme v homogenátu kostní tkáně zjistili statisticky významný pokles koncentrací PINP a CTX. Jestli má na tomto poklesu CTX podíl imobilizace potkanů po operaci nelze říci s jistotou, ale Tomiya se spoluautory potvrdil u potkanů, že imobilizace ocasu vede ke zvýšené exkreci CTX a kyselých fosfatázy močí, k poklesu sérového prokolagenu C – peptidu II již v časně fázi pokusu [20].

Závěr

Naše výsledky ukazují, že abdominální chirurgický zákrok po velmi krátkém čase není schopen ovlivnit denzitu kostního minerálu a biomechanické vlastnosti kostí, tedy odolnost k fraktuře, ale je ovlivněn kostní metabolický obrat pravděpodobně pooperační imobilitou, stresem a změnami v příjmu potravy.

Všechny prezentované výsledky bude nutné potvrdit na jiných chirurgických zákrocích u potkanů a vyloučit případný vliv redukované jaterní tkáně.

Nekomplikovaný chirurgický zákrok jistě nezasáhne do dalšího života lidí s osteoporózou, ale u větších operačních zákroků by se nemělo zapomínat na možnost zhoršení stavu kostí u těchto již dříve postižených pacientů.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura:

1. Wariaghli G, Mounach A, Achemlal L et al. Osteoporosis in chronic liver disease: a case-control study. *Rheumatol Int* 2010;30:893–899.
2. Isaia G, Di Stefano M, Roggia C, Ardissoni P, Rosina F. Bone disorders in cholestatic liver diseases. *Forum (Genova)* 1998;8:28–38.
3. Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol* 1998; 18:178–190.
4. Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater* 2004;7:35–41.
5. Kobayashi ET, Hashimoto F, Kobayashi Y et al. Force-induced rapid changes in cell fate at midpalatal suture cartilage of growing rats. *J Dent Res* 1999;78: 1495–1504.
6. Herrmann M, Seidel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;393:57–75.
7. Gradosova I, Zivna H, Svejtkova K et al. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 2011;66:606–610.
8. Dias JP, Couture R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 2011; doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x.
9. Blaha V, Simek J. Development of metabolic parameters in the early phases of liver regeneration. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove Suppl* 1995;38:37–55.
10. Patterson-Buckendahl P, Pohorecky LA, Kvetnansky R. Differing effects of acute and chronic stressors on plasma osteocalcin and leptin in rats. *Stress* 2007;10: 163–172.
11. Włodarski K, Włodarski P. Leptin as a modulator of osteogenesis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2009;11:1–6.
12. Igwe JC, Jiang X, Paic F et al. Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity. *J Cell Biochem* 2009;108:621–630.
13. Jarfelt M, Fors H, Lannering B, Bjarnason R. Bone mineral density and bone turnover in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Endocrinol* 2006;154:303–309.
14. Burkovskaya TE, Frontasyeva MV, Gundorina SF. Kinetics of elemental content changes of bone tissue of mice during evolution under hypokinetic stress. *Biol Trace Elem Res* 1994;43–45:315–322.
15. Jørgensen L, Jacobsen BK. Functional status of the paretic arm affects the loss of bone mineral in the proximal humerus after stroke: a 1-year prospective study. *Calcif Tissue Int* 2001;68:11–15.
16. Armstrong DW 3rd, Rue JP, Wilckens JH, Frassica FJ. Stress fracture injury in young military men and women. *Bone* 2004;35:806–816.
17. Shaw DT, Rozeboom DW, Hill GM et al. Impact of supplement withdrawal and wheat middling inclusion on bone metabolism, bone strength, and the incidence of bone fractures occurring at slaughter in pigs. *J Anim Sci* 2006;84:1138–1146.
18. Ohishi T, Takahashi M, Kushida K et al. Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998;118:126–130.
19. Napal J, Amado JA, Riancho JA et al. Stress decreases the serum level of osteocalcin. *Bone Miner* 1993;21:113–118.
20. Tomiya M, Fujikawa K, Ichimura S et al. Skeletal unloading induces a full-thickness patellar cartilage defect with increase of urinary collagen II CTX degradation marker in growing rats. *Bone* 2009 Feb;44:295–305.

Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů

Pilotní studie

K. ŠVEJKOVSKÁ¹, I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ^{1,2}, K. DOUBKOVÁ¹, P. ŽIVNÝ¹,
E. ČERMÁKOVÁ³, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

²Radioizotopové laboratoře a Vivárium, LF UK a FN Hradec Králové

³Oddělení výpočetní techniky, UK v Praze, LF v Hradci Králové

SOUHRN

Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Doubková K., Živný P., Čermáková E., Palička V.: **Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů**

Cíl práce: Cílem této studie bylo sledovat ovlivnění kostního metabolismu opakovanými odběry krve a podáváním diety obohacené o železo u samců potkanů kmene Wistar.

Materiál a metody: Zvířata byla krmena buď standardní laboratorní dietou (SLD), nebo SLD obohacenou o železo: fe (SLD+400 mg elementárního železa/1 kg diety), FE+ (SLD+5 g elementárního železa/1 kg diety). Polovině zvířat byl jednou týdně prováděn odběr krve (withdrawal = w) z retroorbitálních sínů. Skupiny zvířat: 1. SLD (standardní laboratorní dieta), 2. SLD-w (SLD a opakované odběry krve), 3. fe (standardní laboratorní dieta obohacená o železo v dávce 400 mg/1 kg diety), 4. fe-w (SLD obohacená o železo v dávce 400 mg/1 kg diety a opakované odběry krve), 5. FE+ (standardní laboratorní dieta obohacená o železo v dávce 5 g/1 kg diety), 6. FE+w (SLD obohacená o železo v dávce 5 g/1 kg diety a opakované odběry krve). Byl vyšetřen krevní obraz, koncentrace železa, ferritinu a markery kostního obratu v séru: osteocalcin, N-terminální propeptid prokolagenu typu I, C-terminální telopeptid kolagenu typu I. Byla změřena hustota kostního minerálu (BMD), obsah vápníku a železa v kosti a biomechanické vlastnosti femuru (tříbodové ohýbání kosti, odolnost krčku femuru v tlaku).

Výsledky: Vlivem diety, obohacené o železo došlo k nárůstu koncentrace hemoglobinu (FE+ vs. fe, $p < 0,01$; fe vs. SLD, $p < 0,05$), hladiny železa v séru (FE+ vs. SLD, fe, $< 0,001$), obsahu železa a vápníku v kosti (FE+, fe vs. SLD, $< 0,001$) a k poklesu počtu erytrocytů (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$; fe vs. SLD, $p < 0,05$). Vlivem krevních odběrů klesl u SLD-w počet erytrocytů (vs. SLD, $p < 0,05$) a vzrostl obsah vápníku v kosti (vs. SLD, $p < 0,01$). U FE+w došlo k poklesu počtu leukocytů (vs. FE+, $p < 0,05$) a koncentrace železa (vs. FE+, $p < 0,05$). BMD celého femuru poklesla u skupiny fe-w vs. fe ($p < 0,05$).

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že zvířata dokázala po krátkou dobu trvání experimentu velmi dobře kompenzovat nejen opakované krevní ztráty, ale také nadbytek železa dodávaného potravou. Nedošlo k ovlivnění kostního metabolismu, ani ke změně biomechanických vlastností kostí.

Klíčová slova: železo, odběry krve, kostní markery, hustota kostního minerálu, biomechanické testování

SUMMARY

Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Doubková K., Živný P., Čermáková E., Palička V.: **Effect of repeated blood withdrawals and iron enriched diet on bone mechanical properties in rats**

Objective: The study aimed at assessing the effect of repeated blood withdrawals and iron-enriched diet on bone metabolism in male Wistar rats.

Material and methods: The rats were fed either with standard laboratory diet (SLD) or with iron-enriched diets. Half of the animals had blood withdrawn (w) from the retro-orbital sinus. The animal groups were as follows: (1) SLD, (2) SLD-w (SLD and repeated blood withdrawals), (3) fe (SLD enriched with iron at a dose of 400 mg/1 kg of the diet), (4) fe-w (SLD enriched with iron at a dose of 400 mg/1 kg of the diet and repeated blood withdrawals), (5) FE+ (SLD enriched with iron at a dose of 5 g/1 kg of the diet), and (6) FE+w (SLD enriched with iron at a dose of 5 g/1 kg of the diet and repeated blood withdrawals). Blood was analyzed for blood count, concentration of iron, ferritin and markers of bone metabolism: osteocalcin, procollagen type I N-terminal propeptide and C-terminal telopeptide of type I collagen. Subsequently, bone mineral density (BMD), calcium and iron content in bone and biomechanical properties of the femur (three-point bending, strength of the femoral neck) were measured.

Results: Iron-enriched diet increased the concentration of haemoglobin (FE+ vs. fe, $p < 0.01$; fe vs. SLD, $p < 0.05$) and serum iron (FE+ vs. SLD, fe, < 0.001), content of iron and calcium in bone (FE+, fe vs. SLD, < 0.001) and decreased erythrocyte count (FE+ vs. SLD, $p < 0.001$; fe vs. SLD, $p < 0.05$). Repeated blood withdrawals decreased erythrocyte count (SLD-w vs. SLD, $p < 0.05$) and increased the content of calcium in bone (SLD-w vs. SLD, $p < 0.01$). Leukocyte count ($p < 0.05$) and iron concentration ($p < 0.05$) were decreased in FE+w (vs. FE+). Total femoral BMD decreased in fe-w (vs. fe, $p < 0.05$).

Conclusion: The results suggest that the rats were able to compensate for not only repeated blood withdrawals but also iron-enriched diet very well. There were no changes in either bone metabolism or mechanical properties.

Keywords: iron, blood withdrawals, bone markers, bone mineral density, biomechanical testing

Osteologický bulletin 2011;16(4):141-147

Adresa: Mgr. Klára Švejková, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika, e-mail: klasvej@seznam.cz

Došlo: 22. 9. 2011

Schváleno: 15. 12. 2011

Úvod

Železo patří mezi mikrobiogenní neboli stopové prvky. Mikrobiogenní prvky se v organismu vyskytují v mikromolárních koncentracích a jsou pro organismus esenciální. Železo je významnou součástí řady enzymů, např. prolyl a lysyl hydroxylázy, 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylázy, ribonukleotid-reduktázy a řady dalších.

Nadbytek železa je pro organismus toxický a nedostatek naopak může vést ke vzniku řady onemocnění.

Nadbytek železa je pro organismus vysoce toxický z důvodu tvorby volných radikálů Fentonovou reakcí [1,2]. Mezi stavy s nadbytkem železa v organismu patří talasemie, srpkovitá anémie, africká sideróza, hereditární hemochromatóza (HHE), dále kouření, alkoholismus, HIV infekce a v neposlední řadě také zástava menstruačního krvácení. Až u 50 % těchto pacientů, kteří mají v organismu vyšší koncentrace železa, byla nalezena osteoporóza [3].

Flebotomie, neboli odběr 250 až 500 ml krve, je velmi efektivní a již přes 50 let používaný přístup v léčbě chorob se zvýšenou zátěží železem, jako je např. hemochromatóza [4]. Tato terapie stimuluje erytropoézu a mobilizuje železo ze zásobních míst. Snížení koncentrace železa redukuje potenciál pro vznik tkáňového poškození indukovaného železem, jako je jaterní fibróza, cirhóza a karcinom jater. Vysoká frekvence opakovaných odběrů krve (4x ročně) vede k poklesu zásob železa a s tím souvisejícího poklesu oxidačního stresu [5]. Chronické ztráty krve mohou ale z důvodu neustálé stimulace stromálního a hematopoetického systému vést k jeho vyčerpání, a stát se tak primárním faktorem rozvoje osteoporózy [6].

Kromě těchto léčebných forem se s flebotomií setkáváme u dobrovolných dárců krve, kteří jsou naopak ohroženi nedostatkem železa v organismu [7], a proto jsou často, převážně premenopauzální ženy, železem suplementovány.

Rovnováha železa v organismu je udržována pouze regulací absorpce z trávicího traktu. Organismus nedokáže odstranit nadbytečné železo jeho vyloučením, může pouze snížit jeho absorpci ve střevě. Proto musí být metabolismus železa, od jeho transportu přes buněčné membrány, distribuci v organismu a uchovávání v intaktní formě, dobře fungujícím mechanismem.

Buňky se liší svojí citlivostí k železu. Osteoblasty, které reprezentují kostní novotvorbu, jsou extrémně citlivé k přítomnosti železa. Železo jejich funkci potlačuje. Naopak osteoklasty resorbující kostní tkáň, jsou schopné fungovat správně i v přítomnosti nadbytku železa. Mezi další buňky, extrémně citlivé k nadbytku železa, patří buňky přední hypofýzy, což vede k nedostatku gonadotropinů s následným rozvojem osteoporózy [8].

Kostní metabolismus je hodnocen sledováním změn koncentrace kostních markerů: osteokalcinu, N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I a C-terminálního telopeptidu

kolagenu typu I. Osteokalcin (OC) je nekolagenní protein produkovaný osteoblasty, osteocyty a odontoblasty. K jeho tvorbě je zapotřebí kalcitriol a vitamín D. Vzniklý intaktní osteokalcin je absorbován do kostní matrix vazbou na hydroxyapatit pomocí reziduí γ -karboxyglutámové kyseliny. Část tohoto intaktního OC může být uvolněna do cirkulace. OC může také projít intracelulárními procesy, nebo být po sekreci degradován, proto je možné v cirkulaci detekovat řadu fragmentů: intaktní OC (1-45), C-terminální fragment (44-49), N-terminální fragment (1-19), MID fragment (20-43) a N-MID OC (1-43). Pro svou malou molekulu (6 kDa) snadno proniká glomerulem a má velmi krátký biologický poločas (4 min.).

Karboxy-terminální telopeptidy kolagenu typu I (CTx) jsou krátké aminokyselinové řetězce, které pocházejí z C-konce kolagenu a jsou vzájemně spojené pyridinolinovými molekulami, tzv. cross-linky. Během degradace kolagenu se uvolňují z kostní hmoty a mohou být detekovány v krevním séru. Mají však malou molekulu (9–20 kDa), a jsou tedy stejně jako OC vylučovány ledvinami.

Amino-terminální propeptidy prokolagenu typu I (PINP) se uvolňují z prokolagenu při syntéze kolagenu. Vzniklé propeptidy, jejichž molekula je bohatá na prolin a hydroxyprolin, jsou uvolňovány do krevního oběhu, kde mohou být detekovány. Sérová koncentrace N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I není ovlivňována funkcí ledvin, jako tomu je u CTx a OC, protože jeho molekulová hmotnost činí 70 kDa.

Cílem této studie bylo zjistit ovlivnění kostního metabolismu po 8 týdnech podávání diety obohacené o železo a po pravidelných odběrech krve u samců potkanů kmene Wistar. Byly sledovány koncentrace markerů kostního obratu, byla změřena hustota kostního minerálu a testována biomechanická odolnost femurů. Porovnávali jsme jak vliv jednotlivých typů diet, tak vliv opakovaných krevních odběrů u zvířat se stejným typem diety. Ve studii byli použiti samci potkanů, abychom se vyhnuli hormonálním změnám v průběhu experimentu. Železo bylo podáváno potkanům per os, abychom se co nejvíce přiblížili běžné klinické praxi suplementace železem.

Materiál a metody

Zvířata:

Experiment byl schválen Odbornou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (Č.j.: 24774/2006-11020). Samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, Česká republika) byli chováni za standardních podmínek: přístup k vodě a potravě *ad libitum*, cyklus 12 hodin světlo/tma, standardní pokojová teplota 22 ± 2 °C. Ve věku 8 týdnů byla zvířata rozdělena do šesti skupin po osmi. Pokus trval 8 týdnů, 2x týdně byla zaznamenávána hmotnost zvířat, spotřeba diety a vody.

Dieta:

Zvířata byla krmena buď standardní laboratorní dietou (SLD, VELAS, a. s., Lysá nad Labem, Česká republika) nebo standardní laboratorní dietou obohacenou o železo (fe, FE+). Železo bylo přidáváno do diety ve formě rozdrčených tablet (Sorbifer Durules, 100 mg Fe²⁺ a 60 mg kyseliny askorbové/1 tableta; EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapešť, Maďarsko). První typ SLD obohacené o železo (fe) obsahoval na 1 kg diety 400 mg elementárního železa a 240 mg kyseliny askorbové. Druhý typ SLD obohacené o železo (FE+) obsahoval na 1 kg diety 5 g elementárního železa a 3 g kyseliny askorbové.

Skupiny zvířat:

Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po osmi jedincích: 1. kontrolní skupina (SLD); 2. kontrolní skupina s opakovanými odběry krve (SLD-w); 3. skupina s fe dietou (fe); 4. skupina s fe dietou a opakovanými odběry krve (fe-w); 5. skupina s FE+ dietou (FE+); 6. skupina s FE+ dietou a opakovanými odběry krve (FE+w).

Pravidelné odběry krve:

V éterové narkóze bylo vybraným skupinám zvířat pravidelně jednou týdně odebíráno 1,5 ml krve. Krev byla odebírána pomocí heparinizovaných kapilár z retroorbitálních síní.

Ukončení studie:

Po 8 týdnech pokusu byla zvířata usmrcena v éterové narkóze odběrem krve z bifurkace břišní aorty. Plná krev byla použita k vyšetření krevního obrazu. Krevní sérum bylo použito ke stanovení koncentrace feritinu a koncentrace markerů kostního metabolismu: CTx, PINP a OC. Zvířatům byla dále odebrána játra, ledviny a slezina. Orgány byly zváženy a zamraženy v plastických sáčcích na -20 °C. Zvířatům byly poté odebrány oba femury, tibie a ocasní obratle. Odebrané kosti byly očištěny od měkké tkáně, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a uchovány při -20 °C.

Laboratorní vyšetření:

V Hematologické laboratoři Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové (LF UK a FN v HK), byl vyšetřen krevní obraz (Abbott CELL-DYN 3200 SL, Abbott, IL, USA). Koncentrace železa v séru byla stanovena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (ÚKBD) LF UK a FN v HK. Obsah železa a vápníku v kostní tkáni (tibie) byl změřen metodou atomové absorpční spektroskopie (ÚKBD LF UK a FN v HK).

V séru byla metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA) změřena koncentrace feritinu (RatFerritin, µg/l, Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA), dále markery kostního obratu: osteokalcin, N-terminální propeptid proko-

Tabulka 1

Koncentrace leukocytů, erytrocytů, hemoglobinu (Hb) a feritinu. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly ($p < 0,05$). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Průměr/medián	Leukocyty (10 ⁹ /l)	Erytrocyty (10 ¹² /l)	Hb (g/l)	Feritin (µg/l)
SLD	5,0 (3,8–7,1)	8,8 ± 0,2 *# P	147,4 ± 3,5 *	2 066,6 ± 302,1
SLD-w	3,7 (3,5–3,9)	8,5 ± 0,1 P	146,7 ± 2,9	1 863,7 ± 199,6
fe	7,8 (4,9–8,1)	8,5 ± 0,2 *	144,9 ± 4,8 *#	1 811,2 ± 204,1
fe-w	3,9 (3,7–7,7)	8,3 ± 0,3	145,4 ± 3,4	1 751,4 ± 352,5
FE+	6,7 (6,1–8,0) P	8,3 ± 0,2 #	152,1 ± 3,6 #	1 763,2 ± 490,9
FE+w	3,9 (3,5–5,0) P	8,2 ± 0,3	151,4 ± 3,9	1 716,5 ± 305,3

Tabulka 2

Obsah železa a vápníku v kosti, koncentrace železa. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly ($p < 0,05$). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Medián (25,-75, percentil)	Železo v kosti (nmol/kg)	Vápník v kosti (nmol/kg)	Železo v séru (µmol/l)
SLD	2,5 (1,9–2,8) *#	9 244,4 (8 556,6–9 484,5) *# P	40,6 (37,3–46,4) *
SLD-w	1,8 (1,7–2,0)	13 569,8 (10 888,8–14 255,7) P	34,5 (32,9–42,7)
fe+	4,4 (3,2–5,2) #	12 409,8 (11 275,4–14 873,2) #	44,8 (35,0–60,0) #
fe+w	2,8 (2,0–3,8)	13 632,5 (10 437,7–14 056,7)	41,3 (33,4–43,7)
FE+	4,9 (4,4–6,4) *	13 532,9 (11 212–17 118,4) * P	75,5 (57,8–85,8) *# P
FE+w	4,5 (4,0–5,1)	13 526,7 (11 923,7–14 858,7) P	54,2 (44,6–64,9) P

lagenu typu I a C-terminální telopeptid kolagenu typu I (Rat-MID Osteocalcin™, Rat/Mouse PINP, RatLaps™-CTX-I, µg/l, Immunodiagnostic Systems Ltd, Velká Británie).

Hustota kostního minerálu:

Kostní minerální hustota (BMD, g/cm²) byla změřena v Osteocentru LF UK a FN v HK pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). BMD byla vyhodnocena na izolovaném femuru, očištěném od měkké tkáně, který byl dále určen pro testování mechanické odolnosti. Všechny analýzy byly zpracovány pomocí vysokorozlišovacího softwaru, navrženého pro studium malých zvířat.

Biomechanické testování:

Testování biomechanických vlastností kostí bylo provedeno na speciálním zařízení, které bylo vyrobeno na zakázku (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika). Femury, které byly uchovávány při -20 °C, byly před testováním rozmrazeny (jedna hodina při pokojové teplotě) a převezeny na změření BMD na ÚKBD LF UK a FN HK. Abychom zabránili vysychání kostní tkáně, byly femu-

ry po celou dobu uchovávány zabalené v gáze zvlhčené fyziologickým roztokem. U každého femuru jsme před testováním změřili délku femuru, jeho tloušťku a označili jsme střed femuru. Při tříbodovém testování mechanické odolnosti (three-point bending; 3PB) byly femury položeny na podpěry se zakulacenými hranami vzdálené od sebe 18 mm tak, aby jedna podpěra byla pod trochanterem major a druhá pod distální částí femuru. Tříbodové testování bylo provedeno v anterioposteriorním (AP) směru (obr. 1). Před vlastním testováním mechanické odolnosti kostní tkáně byly femury zatíženy malým stabilizačním napětím (do 10 N) s použitím třetí podpěry. Tato čepel směřovala kolmo na dlouhou osu femuru a do středu mezi spodní podpěry. Následně byla kost zatížena rychlostí 6 mm/min dokud nedošlo k fraktuře. Síla potřebná ke zlomení kosti byla zaznamenána přístrojem (Digitalanzeiger 9180, Burster praezisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo). Na zlomeném femuru byla změřena mikrometrem (OXFORD 0-25mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie) tloušťka kompakty ve směru lámání, tedy v AP směru. Proximální část femuru byla dále použita pro testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku (obr. 2). Proximální část zlomeného femuru

byla upevněna svisle ve speciálně vyrobeném fixačním zařízení (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika) pomocí samopolymerující adhezivní pryskyřice (Spofacryl-SpofaDental, a. s., Jičín, Česká republika). Hlavice femuru byla zatěžována vertikální silou o rychlosti 6 mm/min pomocí podpěry s plochou hranou, dokud nedošlo ke zlomení krčku femuru. Maximální vyvinutá síla byla opět zaznamenána měřicí jednotkou.

Statistická analýza:

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). K posouzení významnosti byly použity testy: dvouvýběrový *t*-test, případně neparametrický Mann-Whitney, nebo Kolmogorov-Smirnov test s Bonferroniho modifikací. Data byla prezentována jako průměr a směrodatná odchylka nebo jako medián a percentily (25.–75.). Hodnota *p* < 0,05 byla považována za signifikantní.

Výsledky

Vliv diet:

Porovnávali jsme rozdíl mezi skupinami SLD, fe a FE+. Mezi statisticky významně zvýšené hodnoty vlivem diety se železem patří koncentrace hemoglobinu (FE+ vs. fe, *p* < 0,01, fe vs. SLD, *p* < 0,05) (tab. 1), koncentrace

Tabulka 3

Koncentrace kostních markerů. w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe. OC-osteocalcin, PINP-N-terminální propetid prokolagenu typu I, CTx-C-terminální telopeptid typu I.

Průměr/medián	OC (µg/l)	PINP (µg/l)	CTx (µg/l)
SLD	175,5 ± 65,2	37,8 ± 6,0	12,0 (9,9–13,7)
SLD-w	199,9 ± 34,9	39,3 ± 6,2	11,5 (10,6–13,2)
Fe	175,4 ± 46,1	35,7 ± 9,1	9,7 (8,1–11,7)
fe-w	210,1 ± 67,9	38,8 ± 7,9	11,2 (10,0–24,3)
FE+	199,2 ± 43,4	34,3 ± 8,7	10,9 (9,2–15,4)
FE+w	214,2 ± 61,0	39,7 ± 6,9	13,4 (11,0–14,9)

Tabulka 4

Kostní minerální hustota v hodnocených oblastech. Identické symboly představují porovnávané hodnoty se statisticky významnými rozdíly (*p* < 0,05). w-opakované odběry krve, fe- dieta obohacená o 400 mg Fe, FE+ dieta obohacená o 5 g Fe.

Průměr ± SD	BMD globalní (g/cm ²)	BMD diafýza (g/cm ²)	BMD proximální část (g/cm ²)
SLD	0,133 ± 0,054	0,122 ± 0,059	0,141 ± 0,054
SLD-w	0,085 ± 0,016	0,076 ± 0,021	0,092 ± 0,018
fe	0,110 ± 0,039 ^p	0,101 ± 0,038	0,119 ± 0,047
fe-w	0,083 ± 0,013 ^p	0,074 ± 0,017	0,084 ± 0,017
FE+	0,103 ± 0,041	0,093 ± 0,051	0,117 ± 0,037
FE+w	0,089 ± 0,010	0,087 ± 0,018	0,092 ± 0,019

železa v séru (FE+ vs. fe, SLD; $p < 0,001$), obsah železa v kosti a obsah vápníku v kosti (FE+, fe vs. SLD, $p < 0,001$) (tab. 2). Naopak počty erytrocytů vlivem obou diet se železem poklesly (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$; fe vs. SLD, $p < 0,05$) (tab. 1). Diety s různým obsahem železa nevedly ke změnám v hmotnosti zvířat, hmotnosti jater, koncentrace feritinu (tab. 1), koncentrace kostních markerů (tab. 3), hustoty kostního minerálu (tab. 4) ani mechanických vlastností kostí (graf 1 a 2).

Vliv opakovaných krevních odběrů u jednotlivých typů diet:

Porovnávali jsme rozdíl mezi skupinami: SLD vs. SLD-w, fe vs. fe-w a FE+ vs. FE+w.

U skupiny SLD-w došlo k významnému poklesu počtu erytrocytů ($p < 0,05$) (tab. 1) a vzrůstu obsahu vápníku v kosti ve srovnání s SLD ($p < 0,01$) (tab. 2). Skupina FE+w měla statisticky významný pokles v počtu leukocytů ($p < 0,05$) (tab. 1) a pokles v koncentraci železa ve srovnání s FE+ ($p < 0,05$) (tab. 2). Statisticky významný pokles BMD celého femuru byl zjištěn pouze u skupiny fe-w vs. fe ($p < 0,05$) (tab. 4). Opakované odběry krve nevedly ani u jedné ze sledovaných diet ke změnám v hmotnosti zvířat, hmotnosti jater, v koncentraci hemoglobinu a feritinu (tab. 1), nedošlo ke změnám v koncentraci kostních markerů (tab. 3), hustoty kostního minerálu (tab. 4), ani mechanických vlastností kostí (graf 1 a 2).

Diskuze

V naší studii jsme sledovali jak vliv suplementace železem na kostní metabolismus, tak vliv opakovaných krevních odběrů v kombinaci s dietou obohacenou o železo.

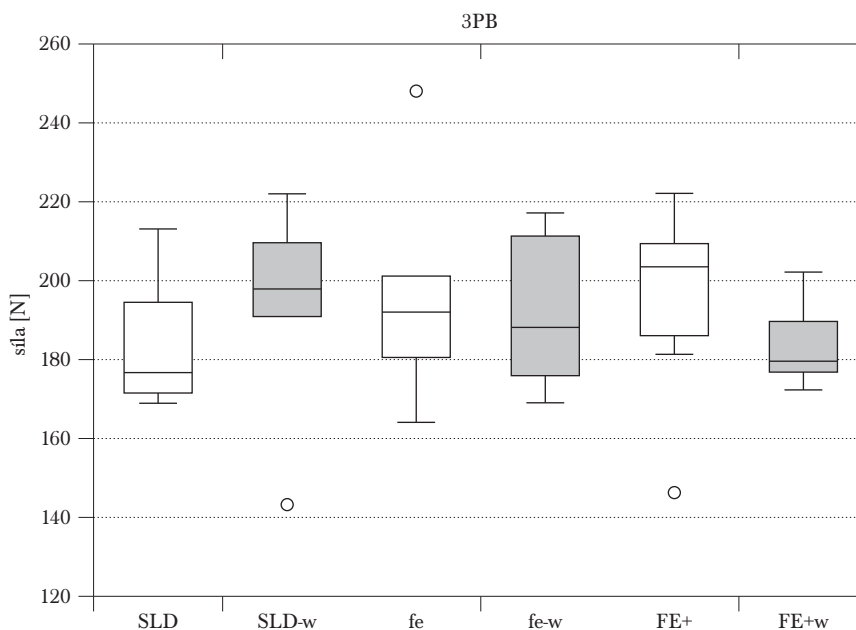
Vliv železa na metabolismus kostí:

V naší studii došlo vlivem diet se zvýšeným obsahem železa ke zvýšení hladin hemoglobinu, koncentrace železa v séru a obsahu železa a vápníku v kosti. Nedošlo ke změnám v hmotnosti zvířat, v počtu leukocytů, trombocytů ani v koncentraci feritinu (tab. 1).

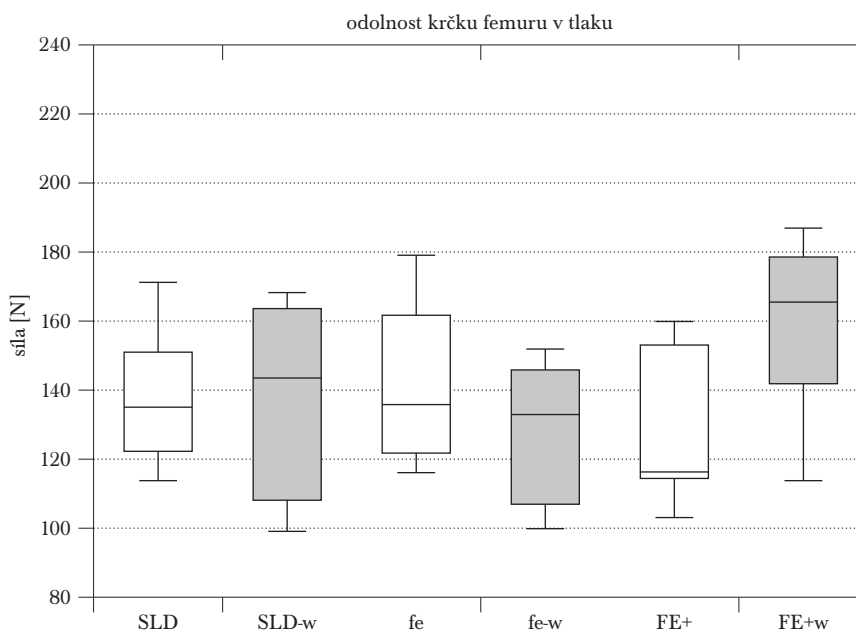
V této práci nedošlo k významným změnám v denzitě kostního minerálu vlivem diety obohacené o železo, je zde ale patrný trend k poklesu kostní minerální hustoty vlivem diet ve všech hodnocených částech femuru (tab. 4). Zajímavý je nárůst, i když opět nevýznamný, v pevnosti kosti vlivem diet

obohacených o železo při tříbodovém testování mechanické odolnosti (3PB) vs. SLD (graf 1). Vlivem těchto diet došlo k významnému zvýšení obsahu železa a vápníku v kostní hmotě ve srovnání se skupinou SLD (tab. 2). Tento náález by mohl souviset s hypotézou Guggenbuhla (2008) o vlivu železa na mineralizaci kostí. Autor předpokládá, že železo má přímý vliv na mineralizaci kostí, a tím na její kvalitu bez ohledu na buňky, proteiny a enzymy. Tento efekt je pravděpodobně způsoben inhibicí růstu a změnou kvality krystalů hydroxyapatitu *in vitro* [9]. Autor ve své dřívější studii našel negativní korelaci mezi koncentrací železa v játrech

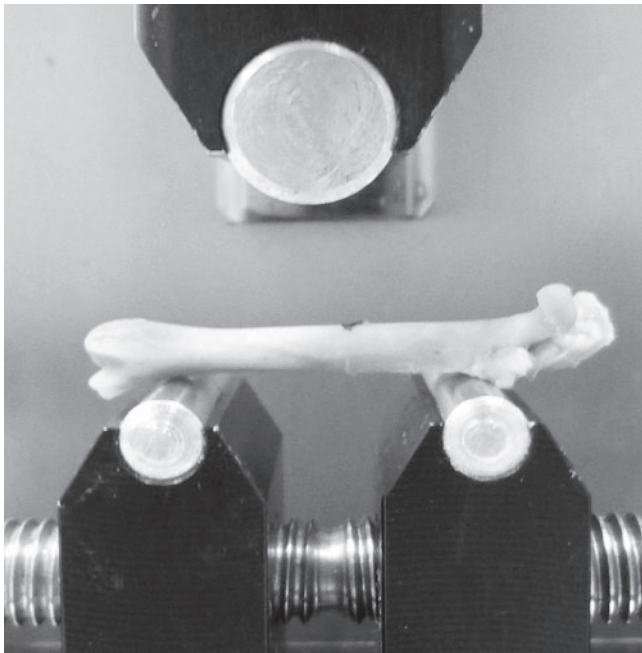
Graf 1
Tříbodové ohýbání diafýzy femuru



Graf 2
Testování odolnosti krčku femuru v tlaku



Obr. 1
Tříbodové ohýbání diafýzy femuru



Obr. 2
Testování odolnosti krčku femuru v tlaku



a BMD krčku femuru, nikoliv však u BMD bederních obratlů [10]. K podobným závěrům dospěl i Kudo (2008), v jehož studii vedlo předávkování železem k poklesu hmotnosti zvířat, k poklesu BMD v oblasti stehenní kosti, což dle autorů vede k následnému rozvoji osteoporózy. Existují však i studie, kde byla zjištěna pozitivní korelace mezi železem v dietě a BMD v oblasti bederních obratlů, trochanteru, krčku femuru, Wardova trojúhelníku a v celém těle [12].

V naší studii nedošlo ke změněm v koncentracích markerů kostního obratu – OC, PINP a CTx a ani v hodnotách biomechanického testování (graf 1 a 2). Zvýšení hladin jak

markerů kostní novotvorby, osteokalcinu a alkalické fosfatázy, tak markerů kostní resorpce, močového pyridinolinu a deoxypyridinolinu a pokles koncentrace parathormonu (PTH) pozoroval ve své studii s dietou obohacenou o železo Matsushima (2001). Objem kosti, tloušťka a počet trabekul ale poklesly. Autor se odkazuje na tvorbu hydroxylového radikálu, případně na přímý vliv iontu železa na enzym kostní resorpce, tartarát rezistentní kyselou fosfatázu. V další studii Matsushima (2003) zjistil zvýšené ukládání železitých iontů na povrchu kosti. Což je v souladu s naším nálezem zvýšeného obsahu železa v kostní tkáni vlivem diety obohacené o železo. V této studii autor pozoroval ztlustění stěn osteoidu a rozvoj osteomalácie. Rozdílné výsledky těchto dvou studií [2,13] odrážejí základní vlastnosti kostních buněk, tedy rychlé odbourávání kosti osteoklasty (po 2 a 4 týdnech na dietě) a pomalejší novotvorba kosti pomocí osteoblastů (po 13 týdnech na dietě).

Zvýšené ukládání železa v kostních buňkách, osteoblastech i osteoklastech, zjistil již v roce 1984 Vernejoul. Ovšem pouze uvnitř osteoblastů vedlo železo k poklesu počtu a aktivity těchto buněk, k poklesu odvodu osteoblastů a snížená byla i syntéza kolagenu. Tuto myšlenku potvrzuje nález osteoporózy až u 25 % pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) [15]. Vliv nadbytku železa na vznik osteoporózy potvrdil ve studii na buněčných kulturách také Yamasaki (2009).

Vliv opakovaných krevních odběrů a suplementace železem na metabolismus kostí

U dobrovolných dárců krve vedou odběry krve k prevalenci rozvoje deficitu železa v organismu [7], u žen k tomu vede již jeden jediný odběr, zatímco u mužů až pravidelné odběry [17]. V mnoha studiích byl prokázán pozitivní vliv suplementace železem na organismus [18,19,20]. Gurevitch (2007) ve své studii potvrdila, že chronické ztráty krve jsou primárním faktorem rozvoje osteoporózy pravděpodobně z důvodu vyčerpání stromálního a hematopoetického systému neustálou stimulací.

V naší studii došlo vlivem opakovaných odběrů krve ke statisticky významnému snížení počtu erytrocytů a leukocytů u SLD+w, ke snížení počtu leukocytů u skupiny FE+w (tab. 1) a k poklesu koncentrace železa v séru u skupiny FE+w (tab. 2) ve srovnání se skupinami bez opakovaných krevních odběrů. U všech skupin byl vlivem odběrů sledován stejný trend v poklesu hmotnosti zvířat, počtu erytrocytů, leukocytů, trombocytů a v poklesu koncentrace železa v séru. Výsledky ale nebyly statisticky významné.

U dobrovolných dárců krve se k posouzení stavu metabolismu železa a určení počtu bezpečných odběrů ročně jeví jako nejvhodnější sledování koncentrace hemoglobinu a ferritinu [18,20]. Změny v těchto parametrech jsme v naší studii nenalezli.

U pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) s osteoporózou bylo po provedení flebotomie prokázáno zlepšení stavu kostní hmoty (nárůst BMD) a to pravděpodobně mobilizací železa z kostí [15].

Pokles hustoty kostního minerálu celého femuru jsme pozorovali pouze u skupiny fe-w vs. fe. Zajímavým nálezem je zvýšený obsah vápníku v kosti u skupiny SLD-w vs. SLD.

Což opět podporuje hypotézu Guggenbuhla (2008), že s nárůstem množství železa v organismu klesá kvalita kosti a naopak. V ostatních parametrech hodnocení stavu kostní hmoty nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Vlivem odběrů je zde patrný, ale statisticky nevýznamný, trend v nárůstu hladin osteokalcinu a PINP, v poklesu obsahu železa v kosti, denzity kostního minerálu ve všech hodnocených oblastech femuru a v poklesu hodnot 3PB u skupin s dietou se zvýšeným obsahem železa.

Z našich výsledků je patrné, že zvířata dokázala velmi dobře kompenzovat nadbytek železa přijímaného *per os* jeho sníženým vstřebáváním. Zároveň také dokázala velmi dobře kompenzovat pravidelné krevní ztráty pravděpodobně proto, že se jednalo o zdravé dospělé samce. V naší studii tedy nedošlo ke změně kostní hmoty, a tím k ovlivnění biomechanických vlastností kostí u potkanů kmene Wistar ani vlivem diety se zvýšeným obsahem železa, ani vlivem opakovaných krevních odběrů.

Seznam zkratk:

AP	anterioposteriorní
BMD	minerální hustota kostí
CTX	karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie
ELISA	enzymová imunoanalýza
HHE	hereditární hemochromatóza
NCSS	Number Cruncher Statistical System
OC	osteokalcin
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I
PTH	parathormon
RIL a VIV	Radioizotopové laboratoře a Vivárium
SLD	standardní laboratorní dieta
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
w	odběr krve (blood withdrawal)
3PB	tříbodové testování mechanické odolnosti

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a SVV 2010–62051.

Literatura

1. Isomura H, Fujie K, Shibata K, Inoue N, Iizuka T, Takebe G, Takahashi K, Nishihira J, Izumi H, Sakamoto W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology* 2004;197(2):93–100.
2. Matshushima S, Hoshimoto M, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron Lactate-Induced Osteopenia in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Pathol* 2001;29(6):623–629.
3. Weinberg ED. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biomaterials* 2006;19(6):633–635.
4. Adams PC, Barton JC. How I treat hemochromatosis. *Blood* 2010;116(3):317–325.
5. Zheng H, Cable R, Spencer B, Votto N, Katz SD. Iron Stores and Vascular Function in Voluntary Blood Donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(8):1577–1583.
6. Gurevitch O, Khitrin S, Valitov A, Slavin S. Osteoporosis of hematologic etiology. *Exp Hematol* 2007;35(1):128–136.
7. Cançado RD, Chiattoni CS, Alonso FF, Langhi DM Júnior, Alves R de C. Iron deficiency in blood donors. *Sao Paulo Med J* 2001;119(4):132–134.
8. Weinberg ED. Role of iron in osteoporosis. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 6(suppl. 1):81–85.
9. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabilieu G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;57(7):903–910.
10. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, Chalès G. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int* 2005;16(12):1809–1814.
11. Kudo H, Suzuki S, Watanabe A, Kikuchi H, Sassa S, Sakamoto S. Effects of coloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology* 2008;246(2–3):143–147.
12. Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, Parkhill C, Weber JL, Flint-Wagner H, Weiss L, Going SB, Lohman TG. Dietary Iron Is Associated with Bone Mineral Density in Healthy Postmenopausal Women. *J Nutr* 2003;133(11):3598–3602.
13. Matshushima S, Torii M, Ozaki K, Narama I. Iron Lactate-Induced Osteomalacia in Association with Osteoblast Dynamics. *Toxicol Pathol* 2003;31(6):646–654.
14. Vernejoul de MC, Pointillart A, Golenzer CC, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D, Miravet I. Effect of iron loading on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol* 1984; 116(3):377–384.
15. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int* 2009;20(4):549–555.
16. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett* 2009;191(2–3):211–215.
17. Javadzadeh SH, Attar M, Taher YM. A study of the prevalence of iron deficiency and its related factors in blood donors of Yazd, Iran, 2003. *Transfus Med* 2005; 15(4):287–293.
18. Mittal R, Marwaha N, Basu S, Mohan H, Kumar A. Evaluation of iron stores in blood donors by serum ferritin. *Indian J Med Res* 2006;124(6):641–646.
19. Maghsudlu M, Nasizadeh S, Toogeh GR, Zandieh T, Parandoush S, Rezayani M. Short-term ferrous sulfate supplementation in female blood donors. *Transfusion* 2008;48(6):1192–1197.
20. Røsvik AS, Hervig T, Wentzel-Larsen T, Ulvik RJ. Effect of iron supplementation on iron status during the first week after blood donation. *Vox Sang* 2010; 98:249–256.
21. Djalali M, Neyestani TR, Bateni J, Siassi F. The effect of repeated blood donations on the iron status of Iranian blood donors attending the Iranian blood transfusion organization. *Int J Vitam Nutr Res* 2006;76(3):132–137.

Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar

P. ŽIVNÝ¹, H. ŽIVNÁ², I. GRADOŠOVÁ², K. ŠVEJKOVSKÁ³, S. HUBENÁ¹, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Hradec Králové,
²Radioizotopové laboratoře a vivárium, Karlova Univerzita Praha, Lékařská fakulta v Hradci Králové,
³CCBR Czech, a. s., Pardubice

SOUHRN

Živný P., Živná H., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Palička V.: **Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar**

Cíl studie: Cílem studie bylo sledovat u potkanů vliv diet navozujících jaterní poškození a steatózu na kostní tkáň. Dali jsme si otázku, zda diety, které ovlivňují metabolismus tuků, též ovlivňují metabolismus kostí a jejich pevnost.

Metodika: Pokusy byly provedeny na dospělých potkanech – samcích kmene Wistar rozdělených do 4 skupin, živných dietami *ad libitum*: standardní laboratorní dietou (SD), dietou se 4 % cholesterolu (CHOL), dietou methionin-cholin deficitní (MCDD) a dietou s 1 % kyseliny orotové (OA). Potkani byli po 28 dnech usmrceni vykrvácením v celkové anestezii. Následně byla stanovena kostní minerální denzita (BMD) pomocí dual energy X-ray absorptiometry (DXA, Hologic, Waltham, MA USA), femury byly vyjmuty a provedeno biomechanické testování jejich odolnosti. V homogenátech kostní tkáně byly stanoveny osteokalcin, prokolagen I N-terminální propeptid (PINP) a carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) metodou EIA (pg/ml). V séru byly stanoveny analyty: glukóza (mmol/l), inzulin (µg/ml) a leptin (pg/ml). Statistika byla provedena software "SigmaStat 3.1" Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ±SEM (p < 0,05) nebo medián (percentil 25%–75%).

Výsledky: Všechny měřené oblasti pomocí DEXA byly nesignifikantně vyšší u skupiny MCDD ve srovnání s ostatními skupinami. Celková kostní denzita (medián) byla vyšší u MCDD (0,160 g/cm²) ve srovnání s ostatními skupinami SD (0,147), CHOL (0,150) a OA (0,149). Síla nutná ke zlomení diafýzy femuru byla u skupin (149 ± 7 N), CHOL group (157 ± 5) a MCDD (148 ± 6) oproti skupině OA (182 ± 2). Síla nutná k fraktuře krčku femuru byla nižší u skupiny SD (129 ± 8 N), CHOL (123 ± 5 N), MCDD (106 ± 5) oproti skupině OA (179 ± 10). Koncentrace osteokalcinu byla u skupiny SD (2,07 ± 0,07), CHOL (2,46 ± 0,09), MCDD (2,11 ± 0,20) a OA (2,56 ± 0,07). Koncentrace PINP byla u skupiny SD (43,8 ± 4,8), CHOL (48,1 ± 4,1), MCDD (48,4 ± 6,8) avšak u OA (36,5 ± 4,4). U CTX nebyly zaznamenány rozdíly mezi skupinami: SD (0,91 ± 0,09), CHOL (0,84 ± 0,05), MCDD (0,91 ± 0,20) a OA (0,91 ± 0,07). Nižší koncentrace leptinu byla u skupiny CHOL (4,84) a OA (5,08) ve srovnání s SD (8,71). Vyšší glykémie byla u skupin CHOL (8,15 ± 0,28) a OA (8,25 ± 0,47) než u SD (5,94 ± 0,21).

Závěry: Naše nálezy naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou vedla u potkanů ke snížení tvorby kolagenu kostní tkáně, nedošlo ke zvýšení BMD ve srovnání s SD, ale došlo ke zvýšení odolnosti kosti při biomechanickém testování. Dieta MCDD naopak vedla k nesignifikantnímu zvýšení BMD, mírnému zvýšení tvorby kolagenu, ale nevedla ke zvýšení odolnosti kosti.

Klíčová slova: cholesterol, játra, potkan, orotová kyselina, methionin, cholin, kost

SUMMARY

Živný P., Živná H., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Palička V.: **Effect of dyslipidaemic diets on bone status in male Wistar rats**

Aim: The influence of dyslipidaemic diets on liver impairment and bone metabolism and bone rigidity was studied. The question was whether liver impairment is a key moment for bone changes or whether bone changes develop independently.

Methods: Male Wistar rats were divided into the following 4 groups (6 rats in each group, 366–440 g): SLD (standard laboratory diet), CHOL (SLD enriched with 4% of cholesterol), MCDD (diet without choline and methionine) and OA (SLD enriched with 1% of orotic acid). The rats were sacrificed by exsanguination after 28 days. Then *post mortem* bone mineral density (BMD) was measured using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA, Hologic, Waltham, MA, USA). The femurs were extracted from animals and broken in a controlled manner using biomechanical testing. Bone homogenate was analyzed for osteocalcin, procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) and carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) by EIA (pg/mL). Serum glucose (mmol/L), insulin (µg/mL) and leptin (pg/mL) were measured. Statistical analyses were performed using the SigmaStat 3.1 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). The data were expressed as mean±SEM (p < 0.05) or median (percentile 25%–75%).

Results: All DEXA parameters were insignificantly higher in the MCDD group than in the other groups. Total BMD (median) was higher in MCDD (0.160) vs. SD (0.147), CHOL (0.150) and OA (0.149). The force to break the femur (N) was in SD (149 ± 7), CHOL (157 ± 5) and MCDD (148 ± 6) vs. OA (182 ± 2). The force to break the femoral neck was in SD (129 ± 8), CHOL (123 ± 5) and MCDD (106 ± 5) vs. OA (179 ± 10). Lower concentration of osteocalcin was in SD (2.07 ± 0.07) vs. CHOL (2.46 ± 0.09), MCDD (2.11 ± 0.20) and OA (2.56 ± 0.07). Higher PINP levels were in SD (43.8 ± 4.8), CHOL (48.0 ± 4.1) and MCDD (48.4 ± 6.8) vs. OA (36.4 ± 4.4). CTX was without differences between the groups: SD (0.91 ± 0.09), CHOL (0.84 ± 0.05), MCDD (0.91 ± 0.20) and OA (0.91 ± 0.07). Lower leptin concentration was in CHOL (4.84) and OA (5.08) vs. SD (8.71). Higher glucose concentration was in CHOL (8.15 ± 0.28) and OA (8.25 ± 0.47) vs. SD (5.94 ± 0.21).

Conclusions: The findings suggest that diet with orotic acid decreased bone collagen formation, did not influence BMD but increased bone rigidity. The other diet without choline and methionine (arginine compensation) leads to higher BMD and PINP, but without improvement of bone rigidity (fracture resistance).

Keywords: cholesterol, liver, rat, orotic acid, methionine, choline, bone

Osteologický bulletin 2011;16(4):148–152

Adresa: Doc. MUDr. Pavel Živný, Osteocentrum, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: živny@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 31. 10. 2011
Přijato k tisku: 4. 1. 2012

Úvod

V klinické praxi je vztah mezi poruchou funkce jater a ovlivněním kvality kosti nebo zvýšením rizika fraktur zcela jednoznačný. Významnější jaterní patologie a často také způsob její terapie (kortikoidy) jsou spojeny se změnami v intermediárním metabolismu, které se dotýkají stavu skeletu a vedou ke zvýšení rizika fraktur. Existují však i specifické vazby mezi jaterní a kostní patologií. Jaterní X receptory (LXR, α, β) jsou na jedné straně důležitým regulátorem metabolismu cholesterolu a modulatory zánětlivých signálů, současně však hrají roli v regulaci kostního metabolického obratu, jsou inhibitory RANKL zprostředkované diferenciace osteoklastů [1]. Cholin-methionin deficitní dieta vede k alteraci kostní tkáně a také ke vzniku jaterní steatózy [2]. Položili jsme si otázku, zda diety, které ovlivňují metabolismus tuků a vedou ke vzniku jaterní steatózy, též paralelně (tedy nikoliv cestou poškození jater) ovlivňují metabolismus kostí a jejich pevnost. Není pochyb, že navození poruchy funkce jater (hepatodystrofie, fatty liver disease) má vliv na metabolismus kostí (kostních buněk, skeletu) [1,3], nelze však zcela vyloučit i přímý vliv diety na kost bez účasti jater. V poslední době se objevují práce, zvažující u různých nox (i dietního původu) orgány zprostředkovaný (při poškození jater nebo ledvin) efekt, nebo přímý efekt na funkci osteoklastů a osteoblastů, a tím na funkci a kvalitu kostní tkáně [4].

Materiál a metody

Diety byly připraveny podle dostupné literatury (www.testdiet.com, www.dyets.com) z kaseinu (PML Inc., Nový Bydžov), kukuřičného škrobu (Škrobárny Pelhřimov), celulózy (Phrikolat, Chemische Erzeugnisse GmbH, Germany), chloridu cholinu, L-cysteinu, L-argininu a sacharózy (Fisher Scientific, Ltd., Pardubice), kukuřičného oleje (CANO Ltd. Heřmanův Městec), DL-methioninu (Sigma-Aldrich, Ltd. Praha), vitamínového a minerálního mixu – AIN-93M Maintenance Purified Diet 5801-M, TestDiet. Tyto základní substance diet tvořily základ kontrolní diety, standardní laboratorní diety (SD). V této dietě bylo 9 % cholinu, 12 % methioninu a 4 % argininu. První experimentální dieta byla obohacena o 4 % cholesterolu (CHOL). Druhá dieta byla připravena bez přídavku methioninu a cholinu (MCDD), nedostatek aminokyselin jsme nahradili 7 % L-argininu. Třetí dieta (OA) vznikla ze základní diety obohacením o 1 % kyseliny orotové. Z těchto směsí byly připraveny pelety a usušeny v sušičce potravin při 55 °C.

Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK HK). Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové (č.j. 8593/2008-30). Byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR) a byli rozděleni do čtyř skupin po 6 zvířatech s tělesnou hmotností 262 ± 6 g na začátku a 414 ± 16 g na konci pokusu. Potkani byli umístěni v plastových klecích a chováni za standardních podmínek. Byli krmeni připravenými dietami a pitnou vodou *ad libitum*.

Skupina SD: živena standardní laboratorní dietou; **skupina CHOL:** standardní laboratorní dieta byla obohacena o 4 % cholesterolu; **skupina MCDD:** standardní laboratorní dieta bez cholinu ani methioninu, obohacena o arginin; **skupina OA:** standardní laboratorní dieta byla obohacena o 1 % kyseliny orotové. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové anestezii za 28 dní.

Poté *post mortem* byla změřena denzita kostního minerálu – bone mineral density (BMD; g/cm^2) dvouenergií absorpční spektrofotometrií v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. BMD v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného programu (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA).

Následně byly vyňaty z potkanů ocasní obratle a pravé femury. S využitím homogenizačního přístroje MagNA Lyser instrument (Roche Applied Science, Německo) jsme homogenizovali části ocasních obratlů (150 mg tkáň/1,5 ml fosfátového pufru). V získaném kostním homogenátu jsme stanovili koncentrace markerů kostního obratu – osteokalcin (OC), prokolagen 1 N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA ($\mu\text{g}/\text{l}$; Uscnlife Sciences & Technology Co., Ltd., Čína).

V séru byly stanoveny koncentrace leptinu (pg/ml), glukózy (mmol/l) a inzulínu ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Tabulka 1
Sérové koncentrace glukózy (mmol/l), inzulínu ($\mu\text{g}/\text{ml}$) a leptinu (pg/ml)

	Glukóza mmol/l	Inzulín ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Leptin (pg/ml)
SD	$5,94 \pm 0,21$	$1,94 \pm 0,24$	8,71 (6,61–10,03)
CHOL	$8,15 \pm 0,28$	$1,50 \pm 0,20$	4,84 (3,86–6,57)
MCDD	$7,01 \pm 0,70$	$2,01 \pm 0,31$	8,44 (5,53–10,58)
OA	$8,25 \pm 0,47$	$2,41 \pm 0,22$	5,08 (4,23–5,86)
	SD vs CHOL $p < 0,01$	NS	SD vs CHOL $p < 0,058$
	SD vs OA $p < 0,01$		SD vs. OA $p < 0,007$

Pravé femury byly kontrolovaně zlomeny v testovacím přístroji (Martin Košek & Pavel Trněčka, Hradec Králové). Před testováním jsme změřili délku femuru a průměr v jeho střední části pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie). Femury byly lámány ve středu diafýzy pomocí tříbodového testování [5,6].

Statistická analýza byla provedena s využitím software "SigmaStat 3.1" Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Metodami One Way Anova, Holm-Sidak Metod. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba ($p < 0,05$) nebo jako medián (a percentily 25%–75%).

Výsledky

Statisticky významné zvýšení glykémie a současně snížení leptinémie bylo zjištěno u skupiny CHOL a OA, tedy po 28 dnech příjmu diety obohacené o cholesterol nebo o kyselinu orotovou ve srovnání se skupinou kontrolní. V koncentracích inzulínu v séru nebyly mezi skupinami statisticky významné rozdíly (tab. 1).

Všechny sledované parametry denzity kostního minerálu

byly statisticky nevýznamně vyšší u skupiny MCDD než u ostatních skupin (tab. 2).

Nižší koncentrace osteokalcinu v kostním homogenátu byly u skupiny SD než u skupin CHOL, MCDD a OA. Vyšší hodnoty PINP byly u skupin CHOL a MCDD ve srovnání se skupinami SD a OA. Koncentrace CTX byly bez významných rozdílů mezi všemi skupinami (tab. 3).

Síla nutná k tříbodovému zlomení femuru (N) byla nižší u skupiny SD, CHOL a MCDD než u skupiny OA. Síla nutná ke zlomení krčku femuru byla nižší u skupiny CHOL a MCDD než u skupiny SD a OA (graf 1).

Mezi skupinami jsme nenalezli žádné statisticky významné rozdíly v délkách femurů a tloušťkách (šířkách) střední části femuru (tab. 4).

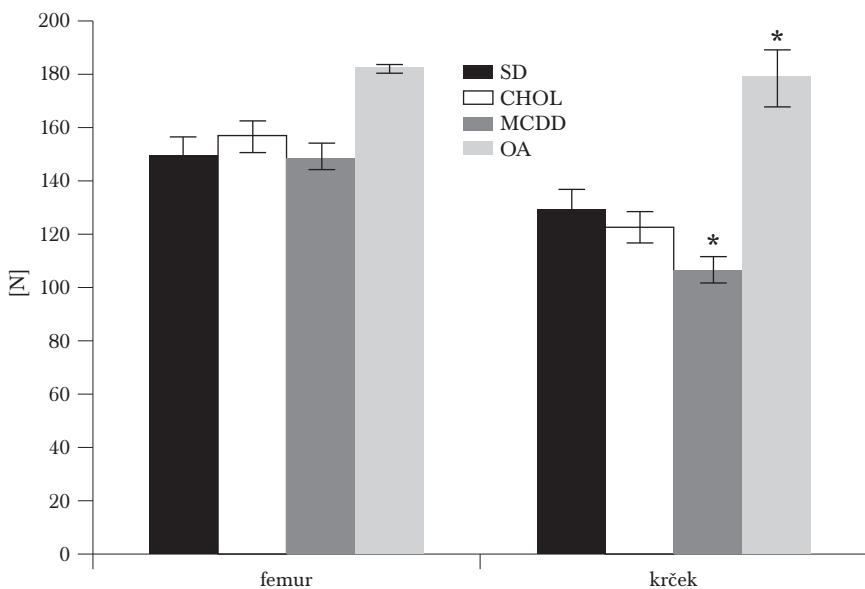
Diskuze

Použité diety vedou ke vzniku jaterní steatózy různými způsoby. Dieta obohacená o cholesterol vede k jaterní steatóze komplexním způsobem, který zahrnuje odlišné regulace některými zásadními mediátory, zejména leptinem. Deficit cholinu a methioninu způsobuje poškození buněčných

membrán jaterních buněk, zejména hepatocytů a jejich organel, jejichž je cholin součástí, dochází ke změnám fosfolipidů zejména v membránách endoplazmatického retikula a celý proces vede k ukládání neutrálních tuků v játrech [7,8]. Dieta se zvýšeným obsahem kyseliny orotové (tj. uracil-6-karboxylová kyselina, dříve označována vitamín B13) rovněž ovlivňuje jaterní metabolismus. Kyselina orotová inhibuje export nově syntetizovaných jaterních lipoproteinů z jater [9], což je velmi závažné, protože játra jsou hlavním zdrojem lipoproteinů obsahujících cholesterol. Dieta s kyselinou orotovou významně zvyšuje aktivitu „rate limiting“ enzymu pro syntézu triglyceridů a současně brání transportu lipoproteinů Golgiho aparátem [10], a tím způsobuje infiltraci jater triacylglyceroly a volnými mastnými kyselinami. Kyselina orotová také zvyšuje koncentraci superoxidového aniontu v játrech a snižuje aktivitu superoxididismutázy [11].

Zůstává otázkou, zda užitím těchto diet, navozujících jaterní poškození, případně steatózu, dochází primárně k poškození jater a následně ke změnám vlastností kostní tkáně, nebo zda tyto změny probíhají paralelně. Doba, po kterou byly diety podávány do usmrcení potkanů a testování vlastností kostí (28 dní), se v našem experimentu zdá být krátká na vývoj patofyziologických změn sériově. Spíše se jeví pravděpodobným paralelní průběh změn v játrech společně se změnami v kostech.

Graf 1
Síly nutné ke zlomení diafýzy femuru a krčku (N)



Tabulka 2
Denzita kostního minerálu u potkanů (g/cm²)

	Celková	Bederní páteř	Ocasní páteř	Pravý femur
SD	0,147 0,144–0,154	0,206 0,199–0,213	0,184 0,177–0,185	0,160 ± 0,004
CHOL	0,150 0,112–0,157	0,200 0,197–0,208	0,195 0,179–0,214	0,164 ± 0,003
MCDD	0,160 0,154–0,163	0,226 0,213–0,231	0,193 0,187–0,199	0,172 ± 0,008
OA	0,149 0,143–0,150	0,202 0,197–0,208	0,185 0,181–0,187	0,162 ± 0,006
	P = 0,085	P = 0,176	P = 0,158	P = 0,603

Paradoxně minimálně se na vlastnostech kostního metabolického obratu a na pevnosti studovaných kostí projevovala dieta s vyšším obsahem cholesterolu. Změny v metabolismu tuků jsou přitom často diskutovaným tématem ve vztahu k metabolismu kostní tkáň. Jaterní X receptor (LXR, α, β), regulátor metabolismu cholesterolu a zánětlivých signálů, je důležitým inhibítozem RANKL-zprostředkované diferenciaci osteoklastů [1]. V humánních multicentrických studiích byly sledovány vztahy metabolismu cholesterolu a kvality kostní tkáň. Pokud u lidí klesaly koncentrace celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, a naopak stoupaly koncentrace HDL-cholesterolu, pak stoupaly také koncentrace kostní alkalické fosfatázy a NTX [12]. Studie na myších ukazují, že HDL může „nepřímou“ ovlivňovat osteoblasty a osteoklasty, ale nejsou údaje o zpětné vazbě kostí směrem k regulaci hladin HDL cholesterolu [13].

Cholin deficitní nebo methionin cholin deficitní diety vedou k rozvoji jaterní steatózy výše popsaným způsobem. Gorustovich a spolupracovníci testovali laminární titanové implantáty v tibiích potkanů při podávání standardní a cholin deficitní diety po dobu 15 a 30 dnů. K rozvoji jaterní steatózy došlo již po 15 dnech podávání cholin deficitní diety. Periimplantační osteogeneze hodnocená histomorfometricky byla nižší o 28 % (15 dní) a 75 % (30 dní podávání diety). Autoři se přiklánějí k závěru, že osteogeneze byla ovlivněna jaterní alterací [3].

Jiní autoři sledovali vliv cholin-methionin deficitní diety na kortikální kost u potkanů. U potkanů živených touto dietou došlo po měsíci k poklesu objemu především kortikální kosti, zejména v souvislosti se zvýšením trabekulární, endokortikální kostní formace, kde hlavní roli hrála redistribuce minerálů v kortikální kosti. Též se vyvíjí jaterní steatóza. Je možné, že tyto procesy probíhají paralelně. V našem experimentu podávaná dieta bez cholinu a methioninu vedla k nálezům vyšší BMD a hodnot PINP, ale nedošlo ke zvýšení pevnosti kostí. Tyto kosti se jeví jako křehčí. Jaterní steatóza se ve sledovaném intervalu nevyvinula, nejspíše vlivem přidaného argininu [14].

Kyselina orotová způsobuje v toxických dávkách jaterní steatózu až hlubší dystrofické změny jaterní tkáň. Kyselina orotová a její soli se vyskytují např. v mléce přežvýkavců, kde jsou výsledkem činnosti střevních bakterií, u vyšších živočichů je kyselina orotová součástí intermediárního metabolismu – dráhy biosyntézy pyrimidinů. Není jasné, zda existuje její fyziologická potřeba a případně v jakých dávkách [15]. V literatuře se vyskytují jen sporadické zmínky o léčbě fraktur dlouhých kostí kalium orotátem [16] i o rychlé resorpci značené kyseliny orotové v regenerující kostní tkáni [17,18,19]. Naše výsledky naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou ve srovnání s kontrolními potkany nemění v žádném sledovaném místě BMD, tlumí však nesignifikantně tvorbu kostního kolagenu (PINP), přispívá nesignifikantně k šířce diafýzy, ale především vede ke zvýšení síly nutné ke zlomení femuru a krčku femuru.

Závěry

Naše výsledky naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou tlumí tvorbu kostního kolagenu, a tím i hodnoty kostní minerální denzity, ale tyto změny jsou následované

Tabulka 3
Ukazatele kostního obratu z homogenátu kostí ($\mu\text{g/l}$)

	Osteokalcin	PINP	CTX
SD	2,07 \pm 0,07	43,84 \pm 4,86	0,91 \pm 0,09
CHOL	2,46 \pm 0,10	48,05 \pm 4,12	0,84 \pm 0,05
MCDD	2,11 \pm 0,29	48,35 \pm 6,83	0,91 \pm 0,20
OA	2,56 \pm 0,07	36,49 \pm 4,39	0,91 \pm 0,07

Tabulka 4
Délka a šířka femuru (mm)

	Délka	Šířka
SD	34,240 \pm 0,324	3,177 \pm 0,0421
CHOL	34,327 \pm 0,607	3,107 \pm 0,0472
MCDD	34,320 \pm 0,205	3,283 \pm 0,0436
OA	34,430 \pm 0,110	3,240 \pm 0,1000
	ns	ns

zvýšenou odolností kostí ke zlomení u samců potkanů kmeny Wistar. Dieta bez cholinu a methioninu (nahrazeno argininem) vedla k nálezům vyšší BMD a hodnot PINP, ale nebyla následována zlepšením pevnosti kostí. Tyto kosti se jeví jako křehčí.

Poděkování: Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura

- Remen KM, Henning P, Lerner UH et al. Activation of Liver X Receptor (LXR) Inhibits Receptor Activator of Nuclear Factor (κ)B Ligand (RANKL)-induced Osteoclast Differentiation in an LXR(β)-dependent Mechanism J Biol Chem 2011;286:33084–33094.
- Iwamoto J, Seki A, Sato Y et al. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bone mass and hepatic lipids in rats with combined methionine-choline deficiency. Bone 2011;48:1015–1021.
- Gorustovich A, de los Esposito M, Guglielmotti MB, Giglio MJ. Periimplant bone healing under experimental hepatic osteodystrophy induced by a choline-deficient diet: a histomorphometric study in rats. Clin Implant Dent Relat Res 2003; 5:124–129.
- Gorustovich AA, Espósito MA, Guglielmotti MB, Giglio MJ. Mandibular bone remodeling under a choline-deficient diet: a histomorphometric study in rats. J Periodontol 2003;74:831–837.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 1993;14:595–608.
- Gradosova I, Zivna H, Svejtkova K, Palicka V, Tichy A, Zivny P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. Pharmazie 2011;66: 606–610.
- Romestaing C, Piquet MA, Bedu E et al. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. Nutr Metab (Lond). 2007;4:4.
- Yu J, Chu ES, Hui AY et al. Lipoprotein lipase activator ameliorates the severity of dietary steatohepatitis. Biochem Biophys Res Commun 2007;356:53–59.
- Hebbachi AM, Seelaender MC, Baker BW, Gibbons GF. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. Biochem J 1997;325 (Pt 3):711–719.
- Su GM, Fiala-Beer E, Weber J et al. Pretranslational upregulation of microsomal CYP4A in rat liver by intake of a high-sucrose, lipid-devoid diet containing orotic acid. Biochem Pharmacol 2005;69:709–717.
- Aoyama Y, Wada M, Morifuji M. Orotic acid added to casein, but not to egg protein, soy protein, or wheat gluten diets increases 1,2-diacylglycerol levels and lo-

- wers superoxide dismutase activities in rat liver. *Biosci Biotechnic Biochem* 2001; 65:2166–2173.
12. Anan K, Mitsuyama S, Yanagita Y et al. Effects of toremifene and anastrozole on serum lipids and bone metabolism in postmenopausal females with estrogen receptor-positive breast cancer: the results of a 2-year multicenter open randomized study. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:775–781.
 13. Ackert-Bicknell CL. HDL cholesterol and bone mineral density: Is there a genetic link? *Bone* 2011; 9: 4C; doi:10.1016/j.bone.2011.07.002
 14. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res* 2005;70:129–136.
 15. Kreuzer M, Vertesy E, Kirchgessner M. Response of renal orotic acid and creatinine to treatments affecting metabolic protein supply of ruminants. *Arch Tierernähr* 1995;48:135–146.
 16. Jeevanandam M, Begay CK, Holaday NJ, Petersen SR. Nutritional and metabolic effects and significance of mild orotic aciduria during dietary supplementation with arginine or its organic salts after trauma injury in rats. *Metabolism* 1997;46: 785–792.
 17. Kuzdenbaeva RS, Sha khiev USh, Utegenov BA, Rystina SA. Effect of potassium orotate on the metabolism of various vitamins in patients with long bone fractures. *Farmakol Toksikol* 1982;45:76–77.
 18. Kuzdenbaeva RS, Sha khiev USh, Utegenov BA. Potassium orotate and polyvitamins in the treatment of fractures. *Ortop Travmatol Protez* 1981;8:24–28.
 19. Matveenko VN. Biosynthesis of pyrimidine nucleotides in normal and regenerating bone tissue. *Vopr Med Khim* 1980;26:162–165.

Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii

I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ², P. ŽIVNÝ¹, S. HUBENÁ¹, K. ŠVEJKOVSKÁ¹, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

²Vivárium a Radioizotopové laboratoře, LF UK, Hradec Králové

SOUHRN

Gradošová I., Živná H., Živný P., Hubená S., Švejkovská K., Palička V.: **Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii**

Cíl: Sledovali jsme vliv často užívaného beta-blokátoru – metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii.

Materiál a metody: Naše studie byla provedena na 24 potkanech rozdělených do 3 skupin (n = 8). Skupina SHAM a kontrolní skupina (KON) po orchidektomii (ORCH) dostávala standardní laboratorní dietu (SLD), experimentální skupina (MET) po ORCH přijímala SLD obohacenou o metoprolol (MET; 27 mg/25 g diety) po dobu 12 týdnů. Kostní metabolismus byl sledován změřením hladin kostních markerů v séru – PINP, OPG a IGF-1 a v kostním homogenátu – CTX-I, BALP, BMP-2. Stanovili jsme hladinu sérového vápníku a jeho množství v tibií. Byla změřena BMD a testována biomechanická odolnost kostní tkáně.

Výsledky: U KON došlo k nárůstu hladin markerů kostního obratu CTX-I (p < 0,001), BALP (p < 0,01), BMP-2 (p < 0,01) vs. SHAM. U MET se snížily hladiny CTX-I (p < 0,001), PINP (p < 0,01), BMP-2 (p < 0,05) a OPG (p < 0,001) vs. KON. U KON klesla sérová koncentrace IGF-1 (p < 0,001) vs. SHAM a u MET došlo k jejímu nárůstu (p < 0,01) vs. KON. Orchidektomie způsobila pokles celotělového BMD (p < 0,001) v oblasti bederních obratlů (p < 0,05), levého femuru (LF; p < 0,01) a pravého femuru (PF; p < 0,001). Testováním biomechanické odolnosti kostní tkáně v oblasti diafýzy LF a PF byl zjištěn pokles tlakové odolnosti u KON (p < 0,01, p < 0,05) vs. SHAM. Změřením sérového vápníku a jeho množství v tibií, BMD a biomechanické odolnosti kostní tkáně u MET nedošlo k statisticky významným změnám v porovnání s KON.

Závěr: Metoprolol má pozitivní vliv na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar snížením kostního obratu, který byl vystupňován vlivem orchidektomie. Po podání beta-blokátoru došlo k zvýšení syntézy IGF-1, který je zodpovědný za správný růst a vývoj kostí.

Klíčová slova: metoprolol, kostní markery, ELISA, DXA, testování biomechanické odolnosti kostní tkáně

SUMMARY

Gradošová I., Živná H., Živný P., Hubená S., Švejkovská K., Palička V.: **Effect of metoprolol on bone metabolism in male Wistar rats after orchidectomy**

Objective: We investigated the effect of the frequently used beta-blocker metoprolol on bone metabolism in male Wistar rats after orchidectomy.

Material and methods: The study was carried out on 24 rats which were divided into 3 groups (n = 8). A sham-operated control group (SHAM) and a control group after orchidectomy (KON) received standard laboratory diet (SLD). An experimental group after orchidectomy (MET) received SLD enriched with metoprolol (27 mg/25 g of the diet) for 12 weeks. Bone metabolism was monitored by measuring the levels of bone markers in serum (PINP, OPG and IGF-1) and in bone homogenate (CTX-I, BALP and BMP-2). The levels of total calcium in serum and the calcium content of the tibiae were determined. Bone mineral density (BMD) and biomechanical testing were performed.

Results: Bone markers (CTX-I, BALP, BMP-2) in KON were higher vs. SHAM (p < 0.001, p < 0.01, p < 0.01, respectively). In MET, there was a decrease in CTX-I, PINP, BMP-2 and OPG vs. KON (p < 0.001, p < 0.01, p < 0.05, p < 0.001, respectively). In KON, there was a decrease in IGF-1 vs. SHAM (p < 0.001). In MET, this was increased vs. KON (p < 0.01). Orchidectomy caused a significant decrease in total body BMD, in lumbar spine BMD and in left (LF) and right (RF) femur (p < 0.001, p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001, respectively). Biomechanical testing of LF and RF diaphyses revealed a decrease in maximal load values in KON vs. SHAM (p < 0.01, p < 0.05). There was no statistically significant change in serum concentrations of total calcium, in the amount of calcium in the tibia, BMD and biomechanical testing in MET vs. KON.

Conclusion: Metoprolol has a positive effect on bone metabolism in male Wistar rats by decreasing bone turnover increased as a result of orchidectomy. After administration of the beta-blocker, there was increased synthesis of IGF-1, which is responsible for proper bone growth and development.

Keywords: metoprolol, bone markers, ELISA, DXA, biomechanical testing of bone tissue

Osteologický bulletin 2011;16(4):153–158

Adresa: Mgr. Iveta Gradošová, Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: gradosovai@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 4. 10. 2011

Přijato k tisku: 7. 12. 2011

Úvod

Arteriální hypertenze se spolu s osteoporózou řadí mezi tzv. civilizační choroby. Tato onemocnění se častěji vyskytují u starších osob. V dnešní době, kdy na nás v průběhu života působí mnoho nepříznivých vlivů, je běžné, že lidé v pokročilém věku často užívají velké množství léků. S přibývajícím věkem dochází k úbytku kostní hmoty, a proto je poslední dobou středem zájmu nových výzkumů, zda běžně předepisované léky nezasahují do kostního metabolismu. Beta-blokátory patří mezi často užívanou skupinu antihipertenziv, mezi které patří také právě metoprolol. O jeho vlivu na kostní metabolismus se zatím mnoho neví a dosavadní data o beta-blokátorech a jejich vlivu na kostní metabolismus jsou nejednotná.

Metoprolol patří mezi lipofilní β_1 -selektivní blokátory bez vnitřní sympatomimetické aktivity. Hlavní mechanismus účinku beta-blokátorů je dán „kardioselektivitou“, tedy blokádu β_1 -receptorů, které se vyskytují především v srdci, ale také např. v ledvinách. Blokádu těchto receptorů dochází k snížení srdečního výdeje, což vede k poklesu srdeční frekvence a snížení kontraktility myokardu a jeho zmenšení nároků na kyslík. V ledvinách inhibují tvorbu reninu, což má rozhodující vliv na antihipertenzní účinek [1]. Při vyšších dávkách metoprolol blokuje také β_2 -receptory [1], které byly též nalezeny na buňkách osteoblastů a osteoklastů [2]. Aktivací sympatického nervového systému, ve kterém hraje roli hormon leptin, dochází k produkci noradrenalinu v kostech, který se váže na β_2 -receptory osteoblastů, a tím inhibuje jejich aktivitu. Navíc, stimulací β_2 -receptorů dochází k produkci ligandu pro aktivátor nukleárního faktoru kappaB (RANKL) osteoblasty, to může vést k aktivaci osteoklastů a tím zvýšené kostní resorpci [3]. Výskyt těchto receptorů na buňkách kostní tkáně naznačuje, že by mohl metoprolol podávaný pacientům ve vyšších dávkách zasahovat pozitivně do kostního metabolismu cestou jejich blokády. Většina dosavadních studií naznačuje, že užívání beta-blokátorů zvyšuje kostní minerální hustotu (BMD) [4,5,6,7] a snižuje riziko zlomenin [4,6,7,8,9,10], ale ne všechny studie se s tímto zjištěním ztotožňují [11].

Osteoporózou trpí nejen ženy, ale často opomíjenými jsou i muži. Vlivem stárnutí dochází k poklesu pohlavních hormonů a u mužů je to především testosteron, který je velmi důležitý pro kostní tkáň. Snížením hladiny sexuelních hormonů dochází k zvýšenému kostnímu obratu s následným snížením hustoty kostního minerálu a poruchou mikroarchitektury kostní tkáně (jak trabekulární, tak kortikální), a s tím spojený vznik křehčích kostí vedoucí ke vzniku fraktur [12]. Cestou aktivace receptorů na osteoblastech testosteronem dochází k následné proliferaci a diferenciaci osteoblastů, produkci růstových faktorů, cytokinů, snížení sekrece interleukinu 6 a prostaglandinu E_2 . Testosteron se metabolizuje enzymem cytochrom-P450-aromatázou, který je přítomen v řadě tkání včetně kostní tkáně v buňkách osteoblastů, na 17β -estradiol [13]. Biologicky dostupný 17β -estradiol je nezávislým prediktorem BMD u starších mužů a je zodpovědný za anabolický účinek androgenů. Estrogen samotný reguluje kostní resorpci, zatímco estrogen a testosteron společně jsou důležité pro kostní novotvorbu u mužů [14].

V našem experimentu jsme sledovali vliv metoprololu na

kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii. Kostní metabolismus byl sledován stanovením markerů kostního obratu. Vyšetřovali jsme kostní minerální hustotu a testovali jsme biomechanickou odolnost kostní tkáně.

Materiál a metody

Zvířata

Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy (LF UK) v Hradci Králové. Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové (č. j. 22106/2010-30). V pokusu byli použiti osmítýdenní samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR). Potkani byli umístěni po 4 v plastových klecích a chováni za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %). Byli krmeni standardní laboratorní dietou (SLD, VELAS, a. s., Lysá nad Labem, ČR) a SLD obohacenou o metoprolol (Albert Weber – SEMED, Praha, ČR) a pitnou vodou *ad libitum*. Hmotnost potkanů byla sledována jednou týdně.

Experiment

Potkani s tělesnou hmotností (BW; 219 ± 8 g) na počátku pokusu byli rozděleni do tří skupin po 8 zvířatech:

1. Skupina SHAM: potkani bez provedené orchidektomie krmeni SLD;
2. Skupina KON: potkani s provedenou orchidektomií krmeni SLD;
3. Skupina MET: potkani s provedenou orchidektomií krmeni SLD obohacenou o metoprolol (27 mg/25 g diety; Egilok, EGIS PHARMACEUTICALS PLC, Budapešť, Maďarsko).

Na začátku pokusu byla potkanům (KON a MET) provedena oboustranná orchidektomie v éterové anestezii. U potkanů SHAM byl proveden pouze operační řez na šourku, který byl následně zašit. Druhý den po operaci se začala podávat experimentálním potkanům (MET) SLD obohacená o metoprolol a skupinám (SHAM a KON) pouze SLD, obě diety *ad libitum*. Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové anestezii. Získané krevní sérum bylo zamraženo na -80 °C. Po usmrcení potkanů byly vyňaty obě tibia a femury, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a zamraženy na -80 °C až do doby analýzy.

Analýzy séra a kostních homogenátů

V krevním séru jsme stanovili koncentraci celkového vápníku na přístroji Modular Roche (Mannheim, Germany) setem (Roche) s využitím o-cresolphtalein komplexonu a hladiny kostních markerů – aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP), osteoprotegerinu (OPG) a inzulínu podobnému růstovému faktoru I (IGF-I) pomocí metody ELISA (Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay).

V kostních homogenátech byly stanoveny hladiny kostních markerů – karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I (CTX-I), kostní formy izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) také metodou ELISA. Homogenát byl připraven z tibie.

Proximální část kosti (0,1 g) jsme homogenizovali v 1,5 ml fosfátového pufru (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) na přístroji MagNA Lyser (Roche) ve třech cyklech při 6 500 rpm po dobu 20 s. Mezi každým cyklem byly vzorky chlazeny v chladícím kruhu (MagNA Lyser Cooling Block). Pro stanovení hladin kostních markerů byly využity kity od firmy Uscn Life Science Inc., Wuhan, Čína (PINP, Procollagen I N-Terminal Propeptide, pg/ml; OPG, Osteoprotegerin, ng/ml; IGF-I Insulin Like Growth Factor I; ng/ml, CTX-I, Cross Linked C-Telopeptide Of Type I Collagen; ng/ml, BALP, Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney; U/l, BMP-2, Bone Morphogenetic Protein 2; ng/ml).

V tibií potkana bylo stanoveno množství vápníku pomocí plamenové fotometrie na plamenovém fotometru EFOX 5053 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany).

Analýzy byly provedeny v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF UK a ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Denzita kostního minerálu

Potkanům byla změřena denzita kostního minerálu (BMD, g/cm²) pomocí dvouenergové rentgenové absorpciometrie (DXA – Dual Energy X-ray Absorptiometry) na přístroji Hologic Delphi A (Hologic, MA, USA) v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. BMD celého těla,

v oblasti bederních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA, Hologic, MA, USA).

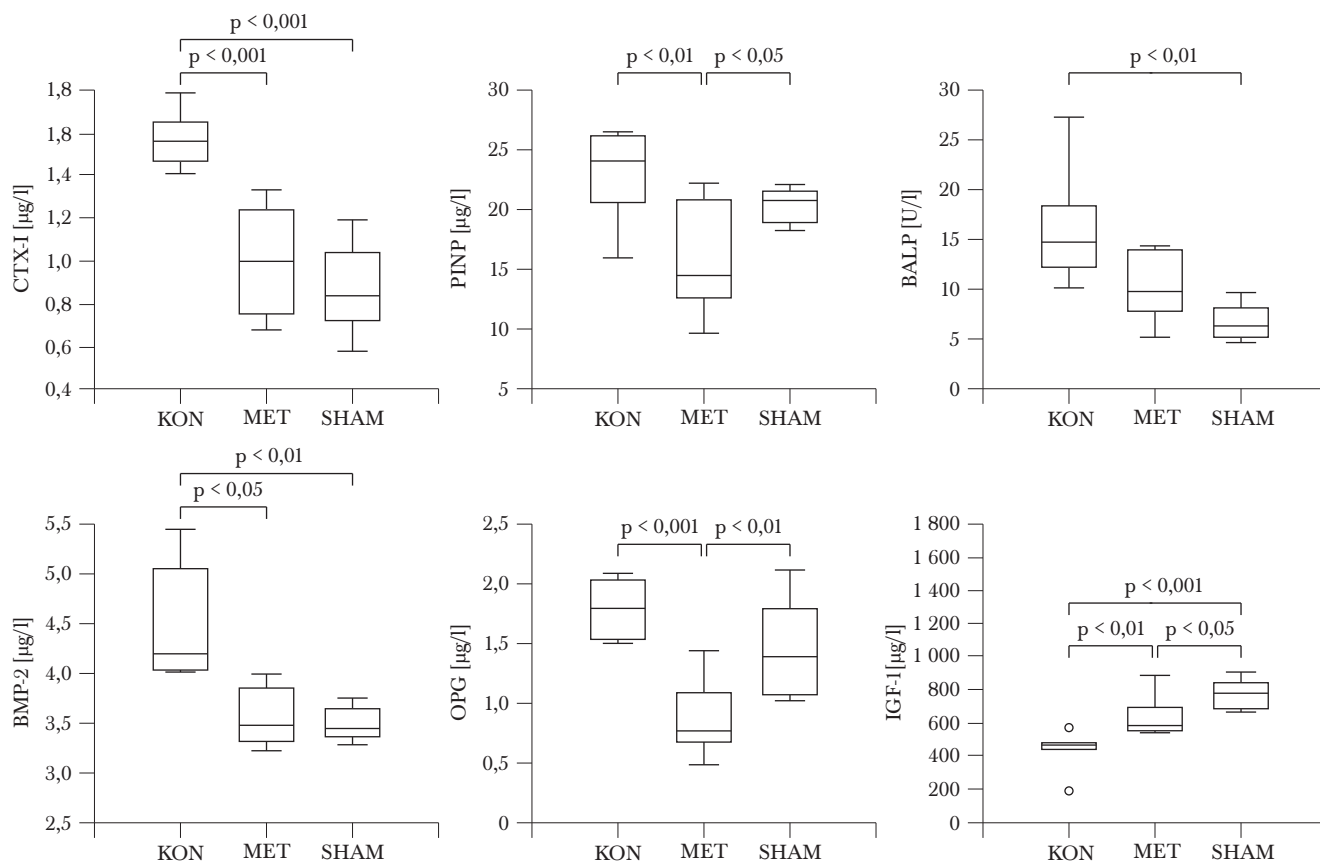
Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Femury byly využity k testování mechanické odolnosti kostní tkáně na speciálním elektromechanickém přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, ČR) pomocí metod three-point bending a tlakové odolnosti krčku femuru, které byly popsány v naší předchozí studii [15]. Po zlomu femuru v oblasti diafýzy byla změřena tloušťka kortikální části kosti pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie).

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kay-ville, Utah, USA). Pro porovnání sledovaných parametrů byla použita analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem a Kruskal-Wallisova neparametrická analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Dunnovým testem (s Bonferoni modifikací). Výsledky jsou vyjádřeny buď jako průměr ± směrodatná odchylka, nebo jako medián a 25. a 75. percentil. Zvolená hladina významnosti byla $\alpha = 0,05$.

Graf 1
Hodnocení markerů kostního obratu



Výsledky

Orchidektomie způsobila signifikantní pokles hmotnosti u skupiny MET na počátku pokusu v porovnání s SHAM. Hmotnost skupiny KON také klesla, ale statisticky nevýznamně vs. SHAM. Po 12 týdnech podávání metoprololu došlo k signifikantnímu poklesu hmotnosti v porovnání s KON (tab. 1).

U potkanů nedošlo k statisticky významné změně v sérových koncentracích celkového vápníku a ani v množství vápníku v tibii (tab. 2).

Stanovením hladin markerů kostního obratu (CTX-I, BMP-2 a BALP) jsme zjistili signifikantní nárůst u potkanů po provedené orchidektomii vs. SHAM. Hladina PINP a OPG statisticky nevýznamně vzrostla v porovnání s SHAM. Po podávání metoprololu došlo k signifikantnímu poklesu CTX-I, PINP, BMP-2 a OPG, u BALP jsme zaznamenali také patrný pokles, který ale nebyl statisticky významný vs. KON. Sérová hladina IGF-I statisticky významně klesla u KON vs. SHAM. U skupiny MET signifikantně vzrostla v porovnání s KON, ale nedosáhla srovnatelné hladiny s SHAM. Výsledky jsou dány do grafů (graf 1).

U potkanů po provedené orchidektomii jsme prokázali snížení BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a obou femurů v porovnání s SHAM. Po podání metoprololu nedošlo k signifikantní změně vs. KON (tab. 3).

U skupiny KON byla statisticky významně kratší délka, slabší průměr i tloušťka kortikální části levého i pravého femuru v porovnání s SHAM. Po podání metoprololu jsme neprokázali nárůst parametrů femuru vs. KON. Testování biomechanické odolnosti kostní tkáně pomocí three-point bending testu ukázalo statisticky významný pokles tlakové síly u skupiny KON vs. SHAM. Po podání metoprololu nedošlo k signifikantní změně tlakové síly v oblasti diafýzy femurů v porovnání s KON. Testováním tlakové odolnosti krčku femurů jsme neprokázali statisticky významný rozdíl (tab. 3).

Tabulka 1

Hmotnost potkanů (SHAM) a potkanů po provedené orchidektomii (KON, MET) na začátku a na konci experimentu

	SHAM	KON	MET
Hmotnost na začátku pokusu (g)	229 ± 12 ^b	220 ± 9	213 ± 7 ^b
Hmotnost na konci pokusu (g)	569 ± 58 ^{a, b}	496 ± 27 ^{b, c}	450 ± 24 ^{a, c}

^a p < 0,001, ^b p < 0,01, ^c p < 0,05

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Tabulka 2

Výsledky množství vápníku v séru a v tibii

	SHAM	KON	MET
Koncentrace vápníku v séru (mmol/l)	2,71 ± 6	2,64 ± 7	2,69 ± 0
Množství vápníku v tibii (umol/g)	621 ± 289	652 ± 468	677 ± 281

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Diskuze

V současnosti máme k dispozici několik studií o vlivu beta-blokátorů na kostní metabolismus a převážná většina z nich demonstruje pozitivní vliv na skelet. Bylo zjištěno, že beta-blokátory pravděpodobně zvyšují novotvorbu kostní hmoty [16]. Mnohé práce uvádějí, že užívání beta-blokátorů zlepšuje kostní minerální hustotu [4,5,6,7] a snižuje riziko fraktur [4,6,7,8,9,10]. Naopak Rejnman et al. (2004) ve své práci uvádí, že perimenopauzální ženy léčené beta-blokátory (též metoprololem) měly trojnásobné riziko vzniku fraktury a o 20 % nižší sérový osteokalcin v porovnání s neléčenými ženami [11].

V naší studii jsme sledovali vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar, který byl narušen vlivem orchidektomie. Lék byl podáván po relativně dlouhou dobu 12 týdnů v dávce srovnatelné s maximální denní dávkou u lidí při zohlednění metabolismu potkana.

Orchidektomie způsobila po 12 týdnech signifikantní pokles tělesné hmotnosti, BMD, zvýšení kostního obratu, zpomalení vývoje kostí a jejich větší lomivost v porovnání s potkany bez provedené orchidektomie. Naše výsledky potvrzují zjištění z předchozích studií, že deficit androgenů u rostoucích potkanů negativně ovlivňuje vývoj kostí a že mladý potkan, který je ve vývinu a po provedené orchidektomii, je vhodným modelem osteopenie [17].

V naší studii došlo u potkanů po orchidektomii k signifikantnímu nárůstu hladin markerů kostní novotvorby BALP, BMP-2 a markeru kostní resorpce CTX-I. Po 12 týdnech podávání metoprololu orchidektomovaným potkanům jsme prokázali snížení kostního obratu. Došlo k signifikantnímu poklesu hladin CTX-I, PINP, BMP-2 a OPG. Kostní alkalická fosfatáza také poklesla, ale bez statistické významnosti.

Je zajímavé, že v našem předchozím experimentu na zdravých dospělých samcích potkanů kmene Wistar, kterým jsme podávali metoprolol v nižší dávce (2 mg/kg tělesné

hmotnosti; BW) a po kratší dobu (8 týdnů), došlo k zvýšení množství růstového faktoru osteoblastů BMP-2 v proximální části tibie [18]. Kostní morfogenetické proteiny (BMP) patří do nadrodiny růstových faktorů TGF- β (Transforming Growth Factor β), které podporují diferenciaci mezenchymálních buněk v chondrocyty a osteoblasty a osteoprogenitorových buněk v osteoblasty [19]. U orchidektomovaných potkanů se hladina BMP-2 v kostním homogenátu po podávání metoprololu signifikantně snížila. Potkani s neporušeným kostním metabolismem reagovali na podání metoprololu v našem předchozím experimentu [18] odlišnou expresí BMP-2 v kostní tkáni než potkani, kteří měli kostní metabolismus narušen vlivem orchidektomie.

Dále výrazně poklesla sérová hladina inzulínu podobného růstového faktoru I u potkanů po orchidektomii (KON). IGF-I je syntetizován mnoha tkáněmi včetně kostní tkáně (růstový faktor

Tabulka 3
 Hodnocení kostní minerální hustoty (BMD) celého těla a ve 3 vybraných oblastech skeletu a hodnocení biomechanických vlastností kostní tkáně femuru

Kostní minerální hustota	SHAM	KON	MET
Celé tělo (g/cm ²)	0,18 (0,18-0,19) a, a*	0,16 (0,16-0,17) a	0,16 (0,16-0,17) a*
Bederní obratle (g/cm ²)	0,23 (0,22-0,26) c, c*	0,19 (0,19-0,21) c	0,21 (0,19-0,22) c*
Levý femur (LF; g/cm ²)	0,20 (0,19-0,20) b, b*	0,17 (0,16-0,18) b	0,17 (0,16-0,18) b*
Pravý femur (PF; g/cm ²)	0,22 (0,20-0,22) a, a*	0,18 (0,17-0,18) a	0,17 (0,16-0,17) a*
Biomechanické testování			
LF délka (mm)	39 (38–39) a, a*	36 (36–37) a	37 (36–38) a*
PF délka (mm)	39 (38–39) a, c	36 (36–37) a	37 (36–38) c
LF průměr (mm)	3,7 (3,5–3,9) b, c	3,4 (3,4–3,5) b	3,5 (3,4–3,6) c
PF průměr (mm)	3,7 (3,6–3,8) b, c	3,5 (3,4–3,6) b	3,5 (3,4–3,6) c
Tloušťka kortikální části kosti LF (mm)	0,7 (0,7–0,8) b	0,7 (0,7–0,7) b	0,7 (0,7–0,7)
Tloušťka kortikální části kosti PF (mm)	0,8 (0,7–1,0) c, c*	0,8 (0,7–0,8) c	0,7 (0,7–0,8) c*
Three-point bending LF (N)	208 (198–227) b, b*	187 (163–196) b	175 (169–205) b*
Three-point bending PF (N)	212 (205–238) c, c*	186 (181–203) c	187 (163–216) c*
Max. tlaková síla krčku LF (N)	154 (110–199)	136 (109–169)	149 (127–166)
Max. tlaková síla krčku PF (N)	146 (102–174)	121 (101–138)	112 (91–158)

a, a* p < 0,001, b, b* p < 0,01, c, c* p < 0,05

Výsledky jsou vyjádřeny u BMD jako průměr ± směrodatná odchylka a u biomechanického testování jako medián (25.–75. percentil).

produkovány osteoblasty). IGF-I je systémovým i lokálním regulátorem, který ovlivňuje proces kostní novotvorby [20]. Naše výsledky ukazují pozitivní vliv metoprololu zvýšením hladiny IGF-I, která byla vlivem orchidektomie snížena.

Orchidektomie také způsobila signifikantní pokles BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a v oblasti femurů a s tím související zvýšení lomivosti, kterou jsme prokázali pouze v oblasti diafýzy femuru. Tlaková odolnost krčku femuru zůstala nezměněna. Vlivem orchidektomie došlo k zpomalení růstu kostí. Femury byly zřetelně kratší a jejich průměr a tloušťka kortikální části kosti signifikantně menší v porovnání se skupinou SHAM. Tento vliv orchidektomie na kosti přikládáme snížené hladině růstového faktoru IGF-I, který pozitivně působí na růst kosti do délky i do šířky a zvyšuje utváření jak její části kortikální, tak trabekulární [21]. V naší předchozí studii metoprolol (2 mg/kg BW) způsobil snížení tlakové odolnosti krčku femuru po 8 týdnech podávání [18]. V této studii metoprolol neovlivnil ani kostní minerální hustotu a ani biomechanické vlastnosti kostí u orchidektomovaných potkanů. Naše výsledky bohužel nepodpořily hypotézu většiny prací, že beta-blokátory zlepšují BMD a snižují riziko vzniku fraktur (tab. 3).

Je pozoruhodné, že výsledky naší předchozí studie na zdravých potkanech a nynější studie na potkanech po provedené orchidektomii se výrazně liší v množství BMP-2 v tibií a ve vlivu na biomechanickou odolnost kostní tkáně. Domníváme se, že efekt metoprololu na kostní metabolismus bude pravděpodobně závislý na jeho dávce a délce podání a také na momentálním stavu kostí, alespoň u potkanů.

Závěr

Výsledky experimentu naznačují, že metoprolol má pozitivní vliv na kostní metabolismus u kastrovaných potkanů snížením kostního obratu, jehož nárůst byl způsoben vlivem orchidektomie. Po 12 týdnech podávání beta-blokátoru nedošlo u orchidektomovaných potkanů k statisticky významným změnám v denzitě kostního minerálu a biomechanických vlastnostech femuru.

Lze předpokládat, že podávání metoprololu hypertonikům s diagnostikovanou osteoporózou, by mohlo mít pozitivní vliv na kostní metabolismus snížením kostního obratu, který bývá u osteoporotických pacientů zvýšen. Pro ověření našich výsledků bude nutno dalších experimentů na potkanech s hypertenzí a indukovanou osteoporózou.

Seznam zkratk:

BALP	kostní forma izoenzymu alkalické fosfatázy (bone alkaline phosphatase)
BMD	kostní minerální hustota (bone mineral density)
BMP-2	kostní morfogenetický protein 2 (bone morphogenetic protein 2)
BW	tělesná hmotnost (body weight)
CTX-I	karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (Dual-Energy X-ray Absorptiometry)
ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
IGF-I	inzulínu podobný růstový faktor I

KON	kontrolní skupina
MET	metoprolol
NCSS	Number Cruncher Statistical System
OPG	osteoprotegerin
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I
RANKL	ligand pro aktivátor nukleárního faktoru kappaB (receptor activator of the nuclear factor-kappaB ligand)
SHAM	falešně operovaný potkan, který podstoupil operaci bez provedené orchidektomie
SLD	standardní laboratorní dieta

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a grantem SVV-2011-262902 Univerzity Karlovy v Praze.

Literatura

- Vítvec J, Špinar J et al. Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění. 2. vydání. Praha, Grada, 2004:248.
- Graham S, Hammond-Jones D, Gamie Z, Polyzois I, Tsiridis E, Tsiridis E. The effect of beta-blockers on bone metabolism as potential drugs under investigation for osteoporosis and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17(9):1281–1299.
- Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8(2):94–104.
- Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2004;19(1):19–24.
- Turker S, Karatosun V, Gunal I. Beta-blockers increase bone mineral density. *Clin Orthop Relat Res* 2006;443:73–74.
- Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, Benhamou CL. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone* 2007;40(5):1209–1216.
- Yang S, Nguyen ND, Center JR, Eisman JA, Nguyen TV. Association between beta-blocker use and fracture risk: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Bone* 2011;48(3):451–455.
- Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA* 2004; 292(11):1326–1332.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens* 2006;24(3):581–589.
- Meisinger C, Heier M, Lang O, Döring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporos Int* 2007;18(9):1189–1195.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K, Mosekilde L. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcif Tissue Int* 2004;75(5):365–372.
- Alexandre C. Androgens and bone metabolism. *Joint Bone Spine* 2005;72(3):202–206.
- Clarke BL, Khosla S. Androgens and bone. *Steroids* 2009;74(3):296–305.
- Růžičková O. Opomíjený problém geriatric: osteoporóza mužů. *Čes ger rev* 2008; 6(2):73–82.
- Gradosova I, Zivna H, Svejkovska K, Palicka V, Tichy A, Zivny P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 2011;66(8):606–610.
- Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002;111(3):305–317.
- Erben RG. Skeletal effects of androgen withdrawal. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1(3):225–233.
- Gradošová I, Švejková K, Živná H, Živný P, Čermáková E, Tichý A, Palička V. Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický bulletin* 2011;16(1):3–7.
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84–A(6):1032–1044.
- Kasukawa Y, Miyakoshi N, Mohan S. The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Curr Pharm Des* 2004;10(21):2577–2592.
- Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Publica Mex* 2009; 51(Suppl. 1):5–17.

Ze světové literatury

J Clin Oncol. 2011 Mar;29(9):1146–1150

Use of Bisphosphonates and Reduced Risk of Colorectal Cancer.

Rennert G, Pinchev M, Rennert HS, Gruber SB.

Bisfosfonáty jsou indikovány k terapii osteoporózy a při kostních metastázách karcinomu prsu, jehož riziko snižují (zřejmě cestou metabolismu mevalonátu). Není známo, zda-li ovlivňují také riziko vzniku jiných karcinomů.

Metodika: The Molecular Epidemiology of Colorectal Cancer je populační kontrolovaná studie, provedená v severním Izraeli, týkající se nemocných s kolorektálním karcinomem a kontrolní skupinou jedinců téhož věku, pohlaví a etnické příslušnosti. Dlouhodobé užívání bisfosfonátů před stanovením diagnózy bylo vyhodnoceno u 933 párů postmenopauzálních pacientek a kontrol.

Výsledky: Užívání bisfosfonátů déle než jeden rok před diagnózou, ale nejméně po dobu jednoho roku, bylo spojeno s významně sníženým relativním rizikem kolorektálního karcinomu (RR 0,50; 95% interval spolehlivosti CI 0,35–0,71). Tento vztah zůstal statisticky významný i po korekci vůči množství vlákniny v jídelníčku, fyzické aktivitě, kolorektálnímu karcinomu v rodinné anamnéze, BMI či užívání malých dávek aspirinu, statinů, vitamínu D nebo hormonální substituce (RR 0,41; 95% CI 0,25–0,67). Současné užívání bisfosfonátů a statinů dále riziko nijak nesnižovalo.

Závěr: Užívání perorálních bisfosfonátů déle než jeden rok je spojeno s 59% poklesem relativního rizika kolorektálního karcinomu, podobně jak to bylo nedávno doloženo u bisfosfonátů a snížením rizika karcinomu prsu.

J Bone Miner Res. 2011 Mar;26(3):530–537

Effects of denosumab on bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis.

Eastell R, Christiansen C, Grauer A, Kutilek S, Libanati C, McClung MR, Reid IR, Resch H, Siris E, Uebelhart D, Wang A, Weryha G, Cummings SR.

Denosumab, lidská monoklonální protilátka vůči RANKL, snižuje míru remodelace kosti, zvyšuje kostní minerální denzitu (BMD) a vede k poklesu rizika zlomenin. Popsaná studie posuzuje časový průběh a faktory určující ukazatele kostního obratu (bone turnover markers, BTM) během léčby denosumabem, procento léčených žen s BTM pod referenčními hodnotami v premenopauze a korelaci mezi změnami BTM a BMD. Zabývala se tím část studie FREEDOM (Fracture REduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months), kde bylo 160 žen náhodně vybráno k podkožní aplikaci 60 mg denosumabu nebo placeba každých 6 měsíců po dobu tří let. Na začátku studie a po 1, 6, 12, 24 a 36 měsících se měřily ukazatele kostní resorpce (C-telopeptidy kolagenu I typu /CTX/; tartarát rezistentní kyselá fosfatáza /TRACP-5b/) a kostní formace (N-terminální propeptid prokolagenu I. typu v séru /PINP/; kostní izoenzym alkalické fosfatázy /BALP/). Pokles CTX byl rychlejší a výraznější než změny PINP a BALP. Měsíc po injekci poklesly u všech žen léčených denosumabem hladiny

CTX pod premenopauzální hodnoty. CTX nálezy na konci terapie byly ovlivněny počátečními hodnotami a intervalem dávkování. Procento jedinců s CTX pod premenopauzálním referenčním intervalem před každou následnou injekcí pokleslo během studie ze 79 % na 51 %. CTX a PINP zůstalo pod premenopauzálními hodnotami ve všech měřených bodech ve 46 % a 31 % u denosumabem léčených žen. Při podávání denosumabu, ale nikoli placeba, významně koreloval pokles CTX se vzestupem BMD ($r = -0,24$ až $-0,44$). Obraz změn ukazatelů kostního obratu při terapii denosumabem je unikátní a lékaři by jej měli využít k efektivnímu monitorování léčby.

Osteoporos Int. 2011 May;22(5):1599–1607

Long-term prospective study of osteoporotic patients treated with percutaneous vertebroplasty after fragility fractures.

Mazzantini M, Carpeggiani P, d'Ascanio A, Bombardieri S, Di Munno O.

Cílem této práce bylo zhodnotit faktory vedoucí k výskytu nových vertebrálních zlomenin (VFX) po perkutánní vertebroplastice (PVP).

Metodika: Jednalo se o prospektivní studii, do níž byli zařazeni nemocní obou pohlaví s osteoporózou a nejméně jednou bolestivou VFX. Na začátku proběhlo základní biochemické zhodnocení a byla zaznamenána demografická data, klinické údaje a provedeno denzitometrické vyšetření. 115 pacientů bylo léčeno PVP a dostalo per os bisfosfonáty s kalcielem a vitamínem D. Nemocní se vrátili ke kontrole po 1, 3 a 6 měsících, pak byli hodnoceni každých šest měsíců. Každý rok, nebo pokud se objevila bolest svědčící pro novou VFX, absolvovali rtg zobrazení bederní páteře.

Výsledky: Doba sledování činila 39 ± 16 měsíců (v rozptě 15–79). 32 pacientů (27,8 %) utrpělo novou VFX, vždy symptomatickou. Všichni byli ochotni podstoupit další PVP. Po porovnání nemocných s novou VFX a bez ní vyšlo najevo, že pacienti s novou VFX mají významně nižší body mass index (BMI) a nižší T-skóre krčku i celkového proximálního femuru. Navíc měli také významně nižší počáteční plazmatické koncentrace 25(OH) vitamínu D. Tento rozdíl přetrvával a byl statisticky významný ještě dvanáct měsíců po PVP: 22 ± 12 ng/ml (jedinci s novou VFX) versus 41 ± 22 ng/ml (jedinci bez fraktury; $p < 0,01$).

Závěr: U nemocných osteoporózou léčených PVP dosahuje incidence nové VFX 27,8 % během 39 měsíců. Výskyt těchto zlomenin je u pacientů léčených PVP spojen s nízkým BMI, poklesem denzity kostního minerálu a deficitem vitamínu D.

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jul;96(7):2081–2088

Effects of Risedronate and Low-Dose Transdermal Testosterone on Bone Mineral Density in Women with Anorexia Nervosa: A Randomized, Placebo-Controlled Study.

Miller KK, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Gleysteen S, Schoenfeld D, Herzog D, Klubanski A.

Mentální anorexii komplikují zlomeniny a významná ztráta kostní hmoty. Patofyziologickým mechanismem je vzestup kostní resorpce a pokles formace kosti. Léčba estrogenu nedokáže u nemocných zabránit ztrátě kostní hmoty a do dnešních dnů nemáme pro tuto situaci účinnou terapii. Autoři si vzali za cíl zjistit, zda u žen s mentální anorexií dokáže denzitu kostního minerálu (BMD) zvýšit samotná antiresorpční léčba bisfosfonátem, nebo je lepší kombinace s nízkodávkovaným transdermálním testosteronem. Proto naplánovali jednoletou, randomizovanou a placebem kontrolovanou studii. Účastnilo se jí 77 žen v ambulantní péči pro mentální anorexii. Ty byly náhodně přiděleny k podávání risedronátu 35 mg jednou týdně; k léčbě nízkou dávkou transdermálního testosteronu, k podávání kombinace obou přípravků nebo dvojího placeba. Hlavním výstupem byla BMD měřená metodou DXA v oblasti bederní páteře, kyčle a na radiu, sledovaly se i změny složení tělesné hmoty.

Výsledky: V porovnání s placebem vedl risedronát ke zvýšení BMD (předozadní páteř +3 %; bočně páteř +4 %, v kyčli +2 %). Aplikace testosteronu nezvýšila BMD, ale způsobila nárůst svalové hmoty. Nežádoucích účinků bylo jen málo.

Závěry: Risedronát, podávaný po dobu jednoho roku ženám s mentální anorexií, zvyšuje BMD bederní páteře. Nízkodávkovaný testosteron nemění BMD, ale zvýší svalovou hmotu.

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jun;96(6):1727–1736
Treatment with denosumab reduces the incidence of new vertebral and hip fractures in postmenopausal women at high risk.

Boonen S, Adachi JD, Man Z, Cummings SR, Lippuner K, Törring O, Gallagher JC, Farrerons J, Wang A, Franchimont N, San Martin J, Grauer A, McClung M.

Studie FREEDOM (Fracture REduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months) prokázala, že denosumab významně snižuje riziko zlomenin u postmenopauzálních žen s osteoporózou. Autoři dále vyhodnotili účinek denosumabu na incidenci nových fraktur obratlů nebo proximálního femuru u podskupin žen s vysokým rizikem těchto zlomenin.

Metodika: FREEDOM byla třiletá, randomizovaná, dvojitě zaslepená a placebem kontrolovaná studie třetí fáze. Na 213 pracovištích na celém světě se jí účastnilo celkem 7 808 postmenopauzálních žen s osteoporózou. Ty byly léčeny denosumabem (60 mg s.c.) nebo placebem každých šest měsíců. Součástí terapie byla denní suplementace kalcie ($\geq 1\ 000$ mg) a vitamínem D (≥ 400 IU).

Hlavní výstup: Tato post hoc analýza hodnotila incidenci fraktur u žen se známými rizikovými faktory včetně mnohočetných a/nebo mírných či závažných předchozích zlomenin obratlů, ve věku 75 let a starších, a/nebo u žen s hodnotou T-skóre denzity kostního minerálu v oblasti krčku femuru $-2,5$ a nižší.

Výsledky: V porovnání s placebem denosumab významně snížil riziko nových zlomenin obratlů u žen s předchozími mnohočetnými a/nebo závažnými frakturami obratlů (16,6 % placebo versus 7,5 % denosumab; $P < 0,001$). Podobně denosumab významně snížil riziko zlomenin v oblasti proximálního femuru u žen v 75 letech věku či starších (2,3 % placebo versus 0,9 % denosumab; $P < 0,01$), nebo

u žen s bazální hodnotou T-skóre denzity kostního minerálu v krčku femuru $-2,5$ a nižší (2,8 % placebo versus 1,4 % denosumab; $P = 0,02$). Tento účinek léčby u jedinců s vysokým rizikem byl podobný jako u nemocných s nižším rizikem fraktury.

Závěry: U postmenopauzálních žen s osteoporózou s vysokým rizikem zlomeniny denosumab snižuje incidenci nových fraktur v oblasti kyčle i obratlů. Nález svědčí pro setrvalý vliv denosumabu na pokles výskytu zlomenin u pacientek s odlišnými stupni rizika.

J Biomater Sci Polym Ed. 2012;22(12):1581–1589
Bone Regeneration by Lactoferrin Released from a Gelatin Hydrogel.

Takaoka R, Hikasa Y, Hayashi K, Tabata Y.

Cílem práce bylo vyhodnotit schopnost laktoferinu (LF), železo vázícího glykoproteinu, navodit regeneraci kosti. Autoři použili biologicky odbouratelný gel, umožňující stabilní uvolňování LF in vivo. Po subkutánní aplikaci na hřbetě myši tento gel déle udržuje LF v místě podání než injikovaný roztok s LF. In vitro pokus s buňkami 3T3E1 (myšimi osteoblasty) ukázal, že tyto buňky při opakovaném přidání LF proliferovaly významně vyšší měrou než po jednorázovém přidání LF v téže dávce. Po implantaci gelu s LF do kostního defektu lbi u pokusných kryš bylo možno pozorovat významně vyšší regeneraci kostní tkáně než u kryš léčených placebem nebo malým množstvím LF. Znamená to, že setrvalé uvolňování LF z gelu umožňuje LF stimulovat regeneraci kosti in vivo.

Hum Reprod. 2011 Jun;26(6):1307–1317

Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa.

Blomberg Jensen M, Bjerrum PJ, Jessen TE, Nielsen JE, Joensen UN, Olesen IA, Petersen JH, Juul A, Dissing S, Jørgensen N.

Lidské spermatozoidní buňky mají receptor pro vitamín D (VDR). Vyřazení VDR a nedostatek vitamínu D vede u pokusných zvířat k poškození fertility, snížení počtu spermií a pohyblivých spermatozoí. Autoři zjišťovali, jakou úlohu má aktivní vitamín D – kalcitriol u lidských spermatozoí a zda plazmatická koncentrace vitamínu D nějak souvisí s kvalitou semene.

Metodika: Vzájemný vztah kvality semene a plazmatických koncentrací vitamínu D byl zkoumán u 300 mužů z běžné populace. Vzorky od 40 mužů byly také použity na in vitro studii k určení vlivu vitamínu D na intracelulární kalcium, motilitu spermií a reakci akrozomu. U všech mužů se kromě analýzy vzorku semene vyšetřoval v krvi folikulostimulační hormon, inhibin B, 25-hydroxyvitamín D, albumin, alkalická fosfatáza, kalcium a parathormon.

Výsledky: 44 % všech vzorků krve svědčilo pro deficit vitamínu D (pod 50 nmol/l 25-hydroxyvitamínu D v plazmě) a toto negativně korelovalo s plazmatickou koncentrací parathormonu ($p < 0,0005$). Koncentrace vitamínu D v plazmě měly pozitivní vztah k motilitě spermií a progresivní motilitě ($p < 0,05$). Muži s deficitem vitamínu D (pod 25 nmol/l) měli ve vzorku méně pohyblivých ($p = 0,027$), progresivně pohyblivých ($p = 0,035$) a morfologicky normálních ($p = 0,044$) spermatozoí v porovnání s muži s dostatečnou saturací vitamínem D (nad 75 nmol/l). In vitro

kalcitriol u lidských spermatozoí zvyšoval nitrobuňčnou koncentraci kalcia cestou VDR zprostředkovaného uvolnění vápníku z intracelulárních zásob, stimuloval motilitu spermií a spouštěl reakci akrozomu.

Závěry: 1,25-dihydroxyvitamin D zvyšuje u zralých spermatozoí intracelulární koncentraci kalcia, pohyblivost spermií a reakci akrozomu. Plazmatické koncentrace vitamínu D mají pozitivní vztah k motilitě spermií. Znamená to, že vitamin D zastává důležitou roli při správné funkci spermií.

Kidney Int. 2011 Jun;79(12):1370–1378

Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease.

Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CA, Lash JP, Hsu CY, Leonard MB, Wolf M.

O růstovém faktoru fibroblastů 23 (fibroblast growth factor 23; FGF23) je známo, že se podílí na regulaci metabolismu fosfátu. Významně také předpovídá mortalitu u dialyzovaných nemocných. Předpokládá se, že FGF23 může být časným ukazatelem poruchy fosfátového metabolismu v počátečních stadiích chronické choroby ledvin (chronic kidney disease; CKD). Autoři změřili FGF23 v počátečních vzorcích u 3 879 nemocných zařazených do Chronic Renal Insufficiency Cohort study, která zahrnuje nemocné s CKD ve stadiu 2–4. Plazmatické koncentrace fosfátu a medián koncentrace parathormonu (PTH) se u vyšetřovaných pohybovaly v normálních mezích. Medián FGF23 byl značně vyšší oproti hodnotám u zdravé populace a významně stoupal s klesající vypočtenou glomerulární filtrací (estimated glomerular filtration rate; eGFR). Vysoké hladiny FGF23, definované jako hodnota nad 100 RU/ml, byly u všech stupňů eGFR častější než sekundární hyperparathyreóza nebo hyperfosfatémie. Prahová hodnota eGFR, při níž začínala koncentrace FGF23 stoupat, byla významně vyšší než odpovídající práh pro PTH založený na navzájem se nepřekrývajících 95% intervalech spolehlivosti. Vzestup FGF23 je tedy běžnou manifestací CKD, která se projeví dříve než vzestup fosfátu nebo PTH. Měření FGF23 by tedy mohlo být citlivým časným ukazatelem poruchy metabolismu fosfátu u nemocných s CKD a normální fosfatémií.

Clin Chem Lab Med. 2011 Aug;49(8):1271–1274

International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Position on bone marker standards in osteoporosis.

Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, Kanis JA.

Pracovní skupina International Osteoporosis Foundation (IOF) a International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), která se zabývá standardy laboratorních markerů kostního obratu (bone turnover markers, BTM), zhodnotila jejich klinický potenciál v předpovědi rizika zlomenin a sledování účinnosti léčby. Dostupná fakta svědčí o tom, že BTM mohou poskytovat informaci o riziku fraktury nezávisle na denzitě kostního minerálu. To znamená, že jejich zařazením do posuzovacího algoritmu by mohlo být určení rizika zlomeniny přesnější. Velkému zájmu se také těší snahy o využití BTM ke zhodnocení odpovědi organismu jednotlivce na léčbu osteoporózy. Změny

navozené terapií specifických markerů reprezentují významnou část míry poklesu rizika fraktury. Nicméně stále není dost pádných důkazů, z nichž by bylo možno v praxi bezpečně vycházet. IOF a IFCC doporučují, aby jeden parametr kostní formace (N-terminální propeptid prokolagenu I. typu v séru; s-PINP) a jeden ukazatel kostní resorpce (C-terminální croslink kolagenu I. typu v séru; s-CTX) byly využity jako referenční markery. Znamenalo by to měřit je standardizovanými postupy v observačních a intervenčních studiích, abychom celosvětově rozšířili zkušenosti s těmito ukazateli v klinické medicíně a vyřešili dosavadní nejistoty jejich klinického využití.

Osteoporos Int. 2011 Jun;22(6):1649–1658

Cardiovascular effects of calcium supplementation.

Reid IR, Bolland MJ, Avenell A, Grey A.

Zkušenosti ze studií u zdravých starších žen a pacientů s poškozením ledvinných funkcí naznačují, že suplementace kalcie zvyšuje riziko kardiovaskulárních nemocí. Aby prozkoumali tuto možnost, naplánovali autoři metaanalýzu studií s podáváním vápníku a zjistili, že při nich stoupá riziko infarktu myokardu o 27–31 % a riziko cévní mozkové příhody o 12–20 %. Tyto nálezy se zdají být platné, protože jsou založeny na předem specifikované analýze randomizovaných, placebem kontrolovaných studií a zjištěné riziko je napříč nimi setrvalé. Fakt, že kardiovaskulární příhody nejsou primárním výstupem žádné z těchto studií, vnáší do hodnocení určitý šum, ale neovlivní jeho nezaujatost. Nedávná reanalýza Women's Health Initiative ukazuje, že současné podávání vitamínu D s kalcie tyto nežádoucí účinky nezmírňuje. Zvýšení rizika kardiovaskulárních příhod při podávání kalcia je ve shodě s epidemiologickými daty o vztahu vyšší plazmatické koncentrace vápníku a kardiovaskulárních chorob v běžné populaci. Existuje několik možných patofyziologických mechanismů, jimiž lze tento vztah vysvětlit – vliv na kalcifikaci cév; na funkci buněk v cévách; na krevní srážlivost. Některé z těchto účinků mohou zprostředkovat i „calcium-sensing“ receptory. Je tedy otázkou, zda farmakologická suplementace vápníkem přináší nějaký užitek: riziko zlomenin trochu snižuje a riziko kardiovaskulární příhody trochu zvyšuje. Podobně jako farmaka příznivě ovlivňují denzitu kostního minerálu také zdroje kalcia v dietě, ale jejich význam při omezení výskytu zlomenin dosud není jasný. Nicméně příjem vápníku, zajištěný vhodným složením stravy, nemá žádný škodlivý vliv na kardiovaskulární systém, a proto by měl být preferován. Dostupná data naznačují, že léčba osteoporózy je i bez současné farmakoterapie kalcie účinná.

Am J Prev Med. 2011 Jul;41(1):68–74.

Ultraviolet B and incidence rates of leukemia worldwide.

Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, Garland FC.

Vědecké poznatky z poslední doby poukazují na možné souvislosti mezi nedostatkem vitamínu D a rizikem rozvoje leukémie. Autoři se pokusili zjistit, zda existuje závislost mezi zeměpisnou šířkou a iradiací ultrafialového záření typu B (UVB) vůči incidenci leukémie ve 175 státech světa. Použili k tomu mezinárodní databázi karcinomů GLOBOCAN. Pomocí mnohočetné regresní analýzy se ve 139 státech podařilo analyzovat vztah mezi UVB a k věku přízřivě

sobenou incidencí leukémie v roce 2002. Studie současně brala v potaz energetický příjem z živočišných zdrojů a výdaje ve zdravotní péči na jednoho obyvatele. Rozbory byly provedeny v roce 2009.

Výsledky: Populace, žijící v zemích na vyšší zeměpisné šířce zaznamenaly vyšší počty leukémií u mužů ($r^2 = 0,34$; $p < 0,0001$) i u žen ($r^2 = 0,24$; $p < 0,0001$). U mužů UVB nezávisle negativně koreluje s incidencí leukémie, zatímco spotřeba energie ze živočišných zdrojů a náklady na zdravotní péči na jednoho obyvatele s incidencí leukémie korelují nezávisle pozitivně ($r^2 = 0,61$ pro model; $p \leq 0,0001$). U žen je iradiace UVB (přepočítaná podle oblačnosti) také v negativní nezávislé korelaci s výskytem leukémie ($p \leq 0,01$), a podobně jako u mužů spotřeba energie ze živočišných zdrojů ($p \leq 0,05$) a náklady na zdravotní péči na jednoho obyvatele ($p = 0,0002$) s incidencí leukémie korelují nezávisle pozitivně ($r^2 = 0,51$ pro model; $p < 0,0001$).

Závěry: Státy s nízkou iradiací UVB mají vyšší incidenci leukémie. Zjištění naznačuje možnost, že nedostatečná saturace organismu vitamínem D v důsledku nízké iradiace UVB může nějakým způsobem zvyšovat riziko rozvoje leukémie.

Stem Cell Res. 2011 Jul;7(1):89–95

Adipose-derived stem cells from the brown bear (*Ursus arctos*) spontaneously undergo chondrogenic and osteogenic differentiation in vitro.

Fink T, Rasmussen JG, Emmersen J, Pilgaard L, Fahlman A, Brunberg S, Josefsson J, Arnemo JM, Zachar V, Swenson JE, Frøbert O.

Medvědi, kteří hibernují v doupěti, netrpí atrofií ani poškozením orgánů, ačkoli se během spánku v podstatě nepohybují. V regeneraci tkání za těchto okolností mohou hrát významnou roli mezenchymální kmenové buňky. Cílem této práce bylo zjistit, zda lze divokým skandinávským medvědům hnědým odebrat kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (adipose tissue-derived stem cells; ASCs) a zjistit jejich vlastnosti. Po ukončení zimního spánku (v průběhu dubna, 7–10 dní po opuštění brlohu) byla u šesti medvědů provedena biopsie tukové tkáně. Ukázalo se, že získané ASCs jsou schopny podle kultivačního media spustit adipogenezi, osteogenezi či chondrogenezi. Je zvláště pozoruhodné, že pokud rostou ve standardním mediu, jsou ASCs,

pocházející z ročních zvířat, schopny spontánně tvořit uzlíky podobné kostní tkáni, obklopené chrupavčitými depozity, což svědčí pro jejich diferenciaci v osteogenní a chondrogenní linii. Tato schopnost se zřejmě ztrácí s postupujícím věkem. Jedná se o první studii, v níž se prováděl odběr a sledoval růst kmenových buněk medvědů hnědých. Jde též o první popis schopnosti ASCs tvořit extracelulární matrix, charakteristickou pro kost a chrupavku, a to spontánně bez specifické stimulace. Nález může mít význam pro použití hibernujících medvědů hnědých jako modelu ke studiu problematiky osteoporózy z inaktivity.

Osteoporos Int. 2011 Dec;22(12):2981–2988

Maintaining femoral bone density in adults: how many steps per day are enough?

Boyer KA, Kiratli BJ, Andriacchi TP, Beaupre GS.

Není známo, jaká doba a intenzita chůze je třeba k zachování zdravého skeletu. Studie posuzovala vztah mezi běžnou chůzí a denzitou kostního minerálu (BMD) u zdravých jedinců s použitím kvantitativní teorie k udržení kostní hmoty. K prevenci osteoporózy je chůze velmi vhodná, ale není jasné, jak dlouho a jakou intenzitou je třeba chodit.

Metodika: U 105 jedinců ve věku 49–64 let byla sledována běžná chůzová aktivita a celková BMD proximálního femuru. K predikci BMD posloužil index kumulativní zátěže (bone density index, BDI). Vztah BDI-BMD byl užít k určení počtu kroků během dne, které dokážou udržet hodnoty BMD pro určité rozmezí tělesné hmotnosti a rychlosti chůze.

Výsledky: BDI významně korelovalo s BMD ($r^2 = 0,19$; $p < 0,001$) pouze u žen, nikoli u mužů. Celkový počet kroků, potřebný k udržení T-skóre $-1,0$ u ženy s průměrnou tělesnou hmotností ve sledované kohortě a pohybující se rychlostí 1 m za sekundu činil 4 892 kroků za den. Podstatně více kroků (18 568 za den) bylo třeba u žen s tělesnou hmotností o 20 % nižší, než byl průměr sledované kohorty. Pokud tyto ženy ušly jen 10 000 kroků za den, pak mohly T-skóre $-1,0$ udržet pouze za cenu rychlosti chůze vyšší než 1,32 m za sekundu.

Závěr: Pohlaví, tělesná hmotnost a rychlost chůze rozhoduje o jejím vlivu na prevenci osteoporózy. U žen s nízkou tělesnou hmotností může být potřeba pravidelné tělesné aktivity ve smyslu chůze k udržení BMD daleko vyšší než obecně proklamovaných 10 000 kroků denně.

Milí čtenáři!

Přáli bychom si, aby pro vás rok 2012 byl radostný a úspěšný. Nechť se vám daří ve vaší práci i v osobním životě.

Redakce

PF 2012

Pokyny autorům

Profil časopisu:

Osteologický bulletin je periodikum, zabývající se klinickou a laboratorní problematikou kostního metabolismu v celé šíři, jak ve vlastních základních, ale i hraničních lékařských, případně, pokud je třeba, i v nelékařských oborech. Přednost se dává informacím s praktickým výstupem.

Zásady vztahu mezi autory a redakcí:

Redakce přijímá příspěvky v češtině, ve slovenštině, nebo angličtině, které odpovídají odbornému profilu časopisu. Kromě zpráv a společenské rubriky jsou všechny přijaté příspěvky podrobeny nezávislé recenzii minimálně dvěma (2) recenzenty, přičemž se zachovává oboustranná anonymita. O výsledcích recenzního řízení je autor zpraven dopisem redakce současně s názorem redakce na konečnou úpravu článku nejpozději do 2 měsíců od doručení příspěvku. Redakce si vyhrazuje právo provádět drobné stylistické úpravy textu a upravovat pravopis podle progresivní verze. Redakce ve vlastní režii doplní překlad názvu a souhrnu příspěvku do angličtiny, pokud autor tyto podklady nedodá v potřebné kvalitě sám.

Před definitivním odevzdáním do tisku bude autorovi (hlavnímu autorovi) zaslán provizorní výtisk práce k autorské korektuře. Při autorské korektuře nelze bez předchozí dohody s redakcí provádět změny textu v rozsahu větším než 5 řádků. Užívejte obvyklých korektorských značek. Korekturu odešlete neprodlženě zpět, nedostane-li ji redakce do 5 pracovních dnů od odeslání, bude to považovat za souhlas autora s textem (je možné použít i faxu nebo e-mailu s naskenovanou přílohou).

Uveřejněná práce se stává majetkem časopisu a přetisknout její část, přesahující rozsah abstraktu nebo použít obrázek v jiné publikaci lze jen se souhlasem vydavatele. Rukopis se archivuje v redakci; autorům se vrací jen, byl-li odmítnut nebo na zvláštní vyžádání.

Zaslání rukopisů:

Všechny rukopisy zasílejte výhradně na dále uvedenou adresu redakce, a to zásadně ve dvojí formě:

- jeden kompletní výtisk s veškerou obrazovou dokumentací, opatřený titulní stranou s podpisem hlavního autora,
- text rukopisu v elektronické podobě (na disketě, CD) včetně titulní strany (viz dále, samozřejmě bez autentického podpisu) spolu s tabulkami, grafy a schémata, pokud byly vyrobeny pomocí počítačového programu. Tabulky, grafy, obrázky a schémata připojte jako samostatné soubory mimo textový soubor. Velmi tím usnadníte konečné zpracování.

Titulní strana obsahuje:

- Název práce, který musí být stručný a výstižný, musí odpovídat skutečnému obsahu sdělení a bez použití zkratk.
- Typ sdělení (viz níže).
- Jména autora a spoluautorů ve zkrácené podobě bez titulů (J. Xyz, B. Yxz, ...), s odkazy na názvy jejich pracovišť.
- V samostatném odstavci celá jména autorů a spoluautorů včetně titulů a vědeckých hodností. Názvy pracovišť, na něž se u jmen odkazuje.
- U prvního (hlavního) autora bude uvedena úplná kontaktní adresa pro další styk s redakcí včetně e-mailové adresy.
- U prvního (hlavního) autora uveďte rovněž telefonní, případně faxové spojení.
- Prohlášení, že zasláný text je určen pro otištění v časopise *Osteologický Bulletin* a nebyl ani nebude jinde publikován a klauzuli, že spoluautoři souhlasí s textem zasláného sdělení a s uveřejněním v tomto časopise.
- U původních a přehledných prací a u krátkých sdělení připojí autor prohlášení (a to i v negativním případě) o sponzorování či střetu zájmů; je-li práce sponzorována (grantem, jinou organizací, výrobcem a pod.) nebo dochází-li ke střetu zájmů (např. autor je přímo či nepřímo zainteresován na výsledcích výroby či prodeje, je majitelem popisovaného patentu a pod.), musí být tato skutečnost v závěru sdělení uvedena.
- U klinických studií připojí autor čestné prohlášení, že studie byla před zahájením schválena místně příslušnou etickou komisí. Prováděly-li se pokusy na zvířatech, vyžaduje se prohlášení, že byly dodrženy ústavní nebo národní předpisy a směrnice pro chov a experimentální užití zvířat.

j) Pod prohlášením (body g,h,i), opatřeným datem, je třeba vlastnoručně podpis hlavního autora.

k) Redakce netrvá na „imprimatur“ přednosty pracoviště autora/autorů.

Typy sdělení:

Každý příspěvek musí být samotnými autory označen jako jedna z následujících variant; podle tohoto zařazení bude v redakci posuzován, v nejasných případech bude konečně zařazení provedeno po dohodě redakce s autorem. Má-li předkládaná práce atypické charakteristiky, je vhodné kontaktovat předem redakci *Osteologického bulletinu* (redakce@trios.cz).

1. Úvodník (Editorial)

Stručná charakteristika konkrétního aktuálního problému z pera erudovaného odborníka, zkušeného a známého autora. Nejčastěji se týká článku či skupiny článků k určité problematice publikovaných ve stejném čísle *Osteologického bulletinu*. Editorial je zadáván redakční radou konkrétnímu autorovi

2. Původní práce (Original article)

Práce obsahuje výsledky vlastního laboratorního, klinického nebo epidemiologického výzkumu. Obvyklý rozsah 8–16 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 2–10; literárních odkazů 10–30. Souhrn v rozsahu 10–20 řádků musí být strukturovaný, tj. dělený na oddíly: Cíl práce – Materiál a metody – Výsledky – Závěr. Vlastní text se dělí na Úvod – Materiál a metody – Výsledky – Diskuzi – Závěr.

Úvod slouží k základnímu seznámení s problematikou, popř. důvody, které vedly autora k vytvoření práce. Uvádí hypotézu, která má být potvrzena či vyvrácena.

Soubor pacientů, materiál a metody (v experimentálních pracích pouze Materiál a metody). Toto je část, která by měla přinést základní informace o hlavních charakteristikách souborů pacientů, v případě experimentální či teoretické studie také o materiálu, který autor hodnotil. Při popisu metody je třeba přesně popsat postup a nedílnou součástí této pasáže je i způsob statistického hodnocení.

Výsledky. Tato část původní práce musí obsahovat fakta zjištěná studií, tj. odpovědi na otázky položené v předchozí části (Materiál, metody). Do této části nepatří interpretace získaných výsledků ani diskuze k nim. Grafické znázornění výsledků je vítáno. Výsledky uvedené v grafické podobě či v tabulkách by neměly být opakovány v textu.

Diskuze slouží k rozboru dosažených výsledků a k jejich srovnání s pracemi jiných autorů zabývajících se stejnou problematikou. Údaje uvedené v části Úvod by se neměly v diskuzi opakovat. Je nutno odlišit logická vysvětlení výsledků od extrapolací či hypotéz založených na získaných výsledcích.

Závěr. Shrnuje význam studie a vyjadřuje, zda bylo dosaženo cílů uvedených v úvodu, resp. zda byla potvrzena původní hypotéza. Závěrečné shrnutí může být též součástí Diskuze.

Původní práce prochází recenzním řízením.

3. Přehledový článek (Review article)

Tato sdělení podávají přehled současných znalostí o určité problematice. V přístupu k tématu musí být patrný osobní názor autora, který musí být jasně oddělen od objektivního výkladu. Obvyklý rozsah 10–20 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 2–10; literárních odkazů 20–50. Souhrn v rozsahu 10–20 řádků musí být výstižný a obsahovat nejdůležitější myšlenky textu. Prochází recenzním řízením.

4. Krátké sdělení (Short communication)

Může se jednat o kazuistiku či jiné zajímavé pozorování z klinické či laboratorní praxe, výsledky pilotní studie, kritický souhrn poznatků o málo známém problému a podobně. Obvyklý rozsah 3–6 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 1–4; literárních odkazů 10–15. Souhrn i v tomto případě musí být výstižný v rozsahu 5–10 řádků. Vlastní text obsahuje úvodní část, vlastní pozorování, diskuzi a závěr. Prochází recenzním řízením.

5. Dopis redakci (Letter-to-the-editor)

Subjektivní názor čtenáře na určitý odborný problém, komentář či polemika k dříve otištěnému sdělení a podobně. Rozsah 1–5 normostran, včetně eventuálních tabulek, grafů, obrázků a literárních odkazů. Maximálně 10 literárních odkazů. Žádný souhrn. Text prochází recenzním řízením, redakce nemusí sdílet stanovisko autora.

6. Zpráva (Report)

Zpráva z kongresu, ze zahraničního pobytu apod., z významných jednání apod. Redakce přijímá taková sdělení, zabývají-li se jasně definovanou a pro naše obory relevantní problematikou. U zprávy z kongresu se zpravidla jedná o jedno téma, jehož prezentaci autor podrobně zpracuje a případně i komentuje. Naopak není žádoucí uvádět výčet přednášek či událostí a o každé z nich se zmínit jednou větou. Rozsah je 1–5 normostran, výjimečně po dohodě s redakcí více. Žádný souhrn. Text neprochází recenzním řízením.

7. Recenze knihy (Book review)

Recenze knihy nebo skript vydaných v ČR nebo SR, které pojednávají o problematice kostního a minerálního metabolismu. Kritické pojetí je žádoucí. Rozsah 1–2 normostrany.

8. Oznámení (Announcement)

Informace o události, jednání či rozhodnutí, které jsou významné pro čtenářskou odbornou komunitu a/nebo mají nadčasový charakter.

V případech hodných zřetele může být použit i jiný typ sdělení.

Součástí časopisu je též „Informační příloha“, která je určena k informacím čtenářské obce o termínech mezinárodních a domácích odborných akcí (kongresový kalendář), o práci garantujících odborných společností, doškolovacích akcích a o významných jednáních s úřady a pojišťovnami. Příspěvatelé do této přílohy nechť kontaktují redakci Osteologického bulletinu (redakce@trios.cz).

Formální náležitosti příspěvků:

Rozsah rukopisu je určen typem sdělení (viz výše). Při úpravě na normostrany se text formátuje tak, aby na stranu formátu A4 vycházelo přibližně 60 úhozů na řádek a 30 řádek na stránku. Stránky je třeba číslovat.

Každý graf, schéma, tabulka, vzorec či obrázek musí být připojen na zvláštním listě, na rubu s uvedením prvního autora a názvu práce. V textu je třeba označit místa, kam mají být příslušné tabulky, grafy či obrázky umístěny. Každá příloha (tabulka, graf, schéma) má být srozumitelná sama o sobě, bez čtení textu. Jsou-li v ní uvedeny zkratky, které se běžně nepoužívají, musí být připojeny vysvětlivky. Redakce si vyhrazuje právo odmítnout rozsáhlé nepřehledné tabulky, stejně jako tabulky v počtu, nepřiměřeném k rozsahu a obsahu textu.

Výsledky vyšetření v číselné podobě uvádějte v jednotkách SI normy, pouze hodnoty pulzu, teploty a krevního tlaku je možné uvádět v konvenčních jednotkách.

K počítačové tvorbě textu, tabulek a grafů lze použít kterýkoliv běžný textový a tabulkový editor; používejte přitom běžných typů písma a před odesláním zkontrolujte vytisknutím zkušební stránky, souhlasí-li písmo na obrazovce s interpretací písma tiskárnou. Pokud by byl autor nucen příspěvek vytvořit v méně běžném či neobvyklém počítačovém programu (např. na bázi MacOs či Unix), doporučuje se toto předem s redakcí konzultovat (redakce@trios.cz).

U grafů je vhodné dodat redakci i výchozí údaje ve formě tabulky; umožní to znovu vytvořit graf způsobem vyhovujícím technologii přípravy časopisu pro tisk. V technicky složitých či nejasných případech konzultujte grafické studio (p. Mgr. Fučík, pfck@bohem-net.cz).

Je-li k rukopisu připojena obrazová dokumentace, je nevhodnější použít originální fotografie, pérovky nebo diapositivy (uveďte vždy jméno autora snímku, obrázku apod.). Připomínáme, že s výjimkou obálky se veškeré ilustrace tisknou černobíle (ve stupních šedi), pro lepší výsledek jsou však s výhodou jako vstupní informace zpracovávány barevné podklady. Fotografie i další ilustrace lze dodat i v elektronické podobě. Před jejich zasláním však doporučujeme konzultovat s grafickým studiem, přípravu-

jícím časopis pro tisk (viz výše) zejména charakter zpracovávaných podkladů, způsob přípravy dat, rozměry ilustrace, barevný prostor, rozlišení, formát dat, velikost souboru, metodu ev. komprimace a způsob zaslání. Zásadně nevhodná forma pro obrazovou i jinou dokumentaci jsou prezentace ve formátu MS PowerPoint nebo z podobných programů.

Zařadí-li autor do rukopisu jakoukoliv dokumentaci nebo významnou partii textu, převzatou z jiné publikace, musí být pramen výslovně uveden a předložen písemný souhlas autora a vydavatele původního pramene. Je výhradně záležitostí autora opatřit si potřebný souhlas a autor za to nese právní odpovědnost. Nejasnosti v tomto ohledu mohou být důvodem k odmítnutí práce.

Použije-li autor v textu zkratky, musí být příslušné výrazy poprvé použity v plném znění a následovány zkratkou uvedenou v závorce. Obsahuje-li text zkratk více, je alternativní možnost připojit jako zvláštní přílohu seznam použitých zkratek.

Názvy léků se uvádějí v generické formě; pouze v případě, chtějí-li autoři z jakéhokoliv důvodu zdůraznit, že šlo o konkrétní přípravek (např. při popisu nežádoucích účinků), uveďte se kromě generického názvu též firmní označení a jméno výrobce.

Názvy mikroorganismů se píší kurzívou, podle platného taxonomického zařazení. Poprvé uváděný název mikroorganismu musí být uveden v nezkrácené podobě (*Staphylococcus aureus*), při jeho opakování se použije zkrácená forma (*S. aureus*).

Sdělení (platí pro klinické i laboratorní práce, pro psaný text, tabulky i obrazovou část) nesmí porušit anonymitu pacienta. Neuvádějte proto v textu jména ani iniciály nemocných, nemocniční a protokolová čísla apod.

Literární odkazy

mají být číslovány v pořadí, v němž byly uvedeny poprvé v textu. Odkazy se udávají pomocí arabských číslic v hranaté závorce. Citace obsahuje:

- příjmení a zkratky jmen autorů, jsou-li více než čtyři autoři, uvádí se první tři autoři, et al.,
- plný název a případně podnázev práce v jazyce originálu,
- standardním způsobem zkrácený název časopisu, rok, svazek, a stránkový rozsah. Inicialy prvních jmen autorů a zkratky názvu časopisu se píší bez teček, za znaky oddělovacími rok, ročník a stránky se nedělá mezera. Při úpravě citací jednotlivých typů dokumentů se řiďte následujícími příklady:

Standardní článek v časopisu:

Epstein S, Inzerillo AM, Caminis J, Zaidi M. Disorders associated with acute rapid and severe bone loss. *J Bone Miner Res* 2003;18:2083–2094.

Článek v supplementu časopisu: Frumin AM. Functional asplenia. *Blood* 1979;54, Suppl 1:26–37.

Monografie (kniha): Wilson SJ. Blood cultures. 3rd ed. New York, Churchill Livingstone, 1992:984.

Kapitola v knize: Leary ET. C-telopeptides. In: Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L, eds: Bone Markers. Biochemical and Clinical Perspectives. London, Martin Dunitz, 2001:39–48

Článek ve sborníku: Winterpacht A. Gene defects in chondrodysplasias. In: Schonau E, ed: Paediatric Osteology. New developments in diagnostics and therapy. Proceedings of the First international workshop on paediatric osteology, 5–7 October 1995, Cologne, Germany. Amsterdam, Elsevier Science, 1996:43–52.

Články z počítačových sítí: Pro citace informací získaných on-line z Internetu nebo nejsou pravidla sjednocená. Pokud jsou údaje dostupné, uvedou se v pořadí – autor – název – pramen (vč. přístupové adresy (URL), resp. emailové adresy autora) – datum vydání či zachycení, případně identifikační číslo, jde-li o příspěvek z diskuzní skupiny nebo je-li výslovně uvedeno. Některé prameny způsob citace doporučují, v takovém případě se řiďte tímto doporučením.

Příspěvky zaslejte na adresu:

Redakce časopisu Osteologický bulletin, TRIOS, s. r. o.

Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

E-mail: redakce@trios.cz

Telefon: 267 912 030, fax: 267 915 563