

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DISERTAČNÍ PRÁCE

2013

PharmDr. Petra ŘEHÁČKOVÁ

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Biomechanické vlastnosti kostí
v experimentu a vliv homocysteinu na
kostní zdraví**

**Biomechanical properties of bones in the experiment and
the effect of homocysteine on bone health**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vědní obor: Gerontofarmacie

**Školitel disertační práce:
Prof. RNDr. Ing. Stanislav Ďoubal, CSc.**

**Konzultanti disertační práce:
Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.
Doc. MUDr. Sylva Skálová, Ph.D.**

HRADEC KRÁLOVÉ 2013

PharmDr. Petra ŘEHÁČKOVÁ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením svého školitele a konzultantů). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum :

Podpis

Ráda bych touto cestou vyjádřila velké poděkování prof. RNDr. Ing. Stanislavu Ďoubalovi, CSc. za odborné vedení, vstřícný přístup a předané zkušenosti během celého doktorandského studia. Zvláště za jeho ochotu, cenné rady, připomínky, odborné materiály a metodickou pomoc při vypracování této disertační práce.

Upřímné poděkování patří externím školitelům, Doc. MUDr. Sylvě Skálové, Ph.D. a především Doc. MUDr. Štěpánu Kutílkovi, CSc. za odborné konzultace, trpělivou pomoc, snahu a ochotu mi pomoci během doktorandského studia.

Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D. a členům katedry za cenné rady, zájem, podporu a pomoc při vyhodnocování získaných výsledků, kterou mi v souvislosti se studiem a disertační prací poskytovali.

Dále děkuji manželovi a rodině za pomoc, trpělivost a pochopení.

Disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu č.: 267004/2013.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: PharmDr. Petra Řeháčková

Školitel: Prof. RNDr. Ing. Stanislav Ďoubal, CSc.

Konzultanti: Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.; Doc. MUDr. Sylva Skálová, Ph.D.

Název disertační práce: **Biomechanické vlastnosti kostí v experimentu a vliv homocysteinu na kostní zdraví**

Tato disertační práce sestává z části experimentální a klinické. Experimentální část se zabývá viskoelastickými vlastnostmi biologických materiálů, v tomto případě kostí při dynamickém namáhání. Klinická část se zabývá vlivem vyšších hladin homocysteinu na kostní zdraví. V teoretickém úvodu je podrobně uveden popis anatomie a fyziologie lidských kostí, jejich vývoj, metabolismus, některá metabolická onemocnění kostí, vliv stravy na jejich kvalitu a vliv homocysteinu na kostní zdraví.

Dále je uveden popis reologických modelů (složených z Hookeova a Newtonova tělesa). Pro ověření, zkoumání a měření byly v experimentální části této práce vybrány kosti prasete domácího, neboť mají podobnou strukturu a biomechanické vlastnosti jako kosti lidské.

V experimentální části byly provedeny dvě série měření s mírně odlišnou konfigurací. Byla zvolena méně obvyklá tzv. rezonanční metoda, využívající přístroje RMA. Jedním z cílů bylo ověřit na vzorcích kostí prasete domácího, že doba uskladnění vzorků (až 15 dní) nemá vliv na jejich viskoelastické vlastnosti. V druhé sérii měření se prokazovala jejich případná frekvenční závislost.

Výsledky 1. série měření neprokázaly, že by se viskoelastické vlastnosti kostí *post mortem* měnily v čase (době uskladnění vzorků). Z výsledků 2. série měření vyplynulo, že měřené vzorky kostí mají elastický a viskózní koeficienty prokazatelně frekvenčně závislé. Z tohoto závěru lze konstatovat, že viskoelastické vlastnosti měřených kostí jsou z biomechanického hlediska nelineární. Dalším z dílčích cílů bylo ověření funkčnosti a aplikovatelnosti přístrojů vyvíjených na katedře Farmaceutické fakulty

UK HK. Praktické zkušenosti z měření přispěly ke zdokonalování konstrukce těchto přístrojů.

V klinické části práce je hodnocen vliv vyšších hladin homocysteinu na kostní zdraví u dětí a dospívajících (celkem 37 subjektů). U postmenopauzálních žen existuje vztah mezi vysokou hladinou homocysteinu v séru a nízkou densitou kostního minerálu a zvýšeným rizikem zlomenin. U dětí a dorostenců dosud neexistují souvislé údaje o vztahu hladiny homocysteinu v séru (S-Hcy) a stavem skeletu. Z laboratorních výsledků krevního séra byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou alkalické fosfatázy a hladinou osteokalcinu, dále mezi hladinou alkalické fosfatázy a hladinou CrossLaps a korelace mezi hladinou osteokalcinu a hladinou CrossLaps. Tyto výsledky prokazují zvýšený kostní obrat a negativní vliv vyšších hodnot S-Hcy na kostní densitu u dětí. Vyšší hodnoty sérového homocysteinu představují rizikový faktor pro kostní zdraví nejenom u postmenopauzálních žen, ale též v dětském a dorostovém věku.

Kosti jsou v reálných podmínkách zatěžovány převážně dynamicky a právě toto namáhání je častým důvodem fraktur kostí. Obzvláště významné je toto riziko u kostí se sníženou densitou. Biomechanické vlastnosti kostí totiž nejsou doposud podrobně popsány právě při dynamickém namáhání. Teoretické i praktické poznatky jak z experimentální, tak z klinické části, mohou být do budoucna nápomocny v lékařském odvětví.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: PharmDr. Petra Řeháčková

Supervisor: Prof. RNDr. Ing. Stanislav Ďoubal, CSc.

Consultants: Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.; Doc. MUDr. Sylva Skálová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: **Biomechanical properties of bones in the experiment and the effect of homocysteine on bone health**

The Doctoral Thesis comprises two basic parts - the Experimental and Clinical. The former one addresses viscoelastic properties of biological materials, in particular bones under dynamic strain. The latter one focuses on the effect of elevated homocysteine levels on bone health. The Introduction includes detailed anatomical description and physiology of human bone, its development, metabolism, and finally some metabolic disorders, the impact of nourishment on its quality and the impact of homocysteine on bone health.

Furthermore, the Introduction contains description of Rheological models (described by Hooke's and Newton's elements). As porcine bones resemble human bones in their structure and biomechanical properties, they were used in the Experimental part with the main objective to verify, investigate and measure their characteristics.

Two series of measurement with moderate changes in configuration were conducted in the Experimental part using the less frequent Resonance method and RMA devices. Firstly, one of the objectives was to verify whether the storage period of samples (up to 15 days) affects bone viscoelastic properties. Secondly, the second series of measurement were supposed to prove potential frequency dependence of bone.

The results of the first series measurement did not prove any *post mortem* changes over the time subjected to the study. However, the second measurement indicated that the elastic and viscous coefficients were demonstrably frequency dependent. It may be concluded that the viscoelastic properties of the measured bones are nonlinear as far as the biomechanical point of view is considered. Another partial objective was to verify the functionality and applicability of devices being developed at the Faculty of Pharmacy in

Hradec Králové, Charles University in Prague. Practical experience from the measurement has contributed to improvement of both design and function of the aforementioned devices.

The Clinical part of the Doctoral Thesis focusses on the effects of elevated homocysteine levels on bone health of children and adolescents (37 subjects in total). In postmenopausal women the elevated serum homocysteine levels correlate with low bone mineral density and thus increase the risk of bone fracture. Notwithstanding, there are no coherent data on the relationship between the serum homocysteine levels (S-Hcy) and state of the skeleton. The laboratory results of blood serum showed, firstly, positive correlation between serum alkaline phosphatase levels and osteocalcin levels; secondly, serum alkaline phosphatase levels and CrossLaps levels; and thirdly, serum osteocalcin levels and CrossLaps levels. These results demonstrate increased bone turnover and the negative effect of elevated levels of S-Hcy on bone density in children. Higher serum homocysteine levels are perceived as a risk factor for bone health not only in postmenopausal women but also in childhood and adolescence.

The bones are in real conditions loaded mainly dynamically. Therefore, this dynamic strain often leads to bone fractures causing particular risk in bones with reduced bone mineral density. So far, biomechanical properties of bone have not been described in detail as far as dynamic strain is concerned. Theoretical and practical knowledge described in both the Experimental and Clinical part may be useful for the medical industry in future.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Charakteristika a vlastnosti kostí	14
2.1.1 Anatomie a fyziologie lidské kosti.....	14
2.1.2 Anatomie a fyziologie kosti prasete domácího	17
2.1.3 Vývoj a růst lidských kostí.....	20
2.1.4 Metabolismus kostí	25
2.1.5 Vybraná metabolická onemocnění kostí.....	28
2.1.5.1 Osteoporóza.....	28
2.1.5.2 Osteomalacie a rachitis	30
2.1.5.3 Pagetova kostní choroba	31
2.1.6 Vliv stravy na kvalitu kostí	32
2.1.6.1 Minerální látky ovlivňující tvorbu kostí	32
2.1.6.2 Vitaminy ovlivňující tvorbu kostí	33
2.1.7 Homocystein a jeho vliv na kostní zdraví.....	35
2.1.8 Biomechanické vlastnosti kostí.....	36
2.2 Mechanické chování viskoelastických těles.....	38
2.2.1 Reologické modely mechanického chování.....	38
2.2.1.1 Klasická reologie.....	38
2.2.1.2 Lineárně elastická tělesa	39
2.2.1.3 Nelineárně elastická tělesa	40
2.2.1.4 Reologické modely lineárně viskoelastických těles.....	42
2.2.2 Dynamické chování viskoelastických těles.....	49
2.2.2.1 Základní diferenciální rovnice pro lineární viskoelastické systémy	49
2.2.2.2 Disipace energie u viskoelastických těles	53
2.2.2.3 Tlumení sil a deformací v soustavách viskoelastických těles.....	54
2.2.2.4 Řešení inverzního problému	56

2.2.3	Dynamická pevnost viskoelastických těles	57
2.2.4	Dynamická pevnost těles chovajících se podle Voigtova modelu	58
2.2.5	Přístroje pro dynamická měření	63
2.2.5.1	Přístroje pro dynamická měření – DMA	63
2.2.5.2	Přístroje pro dynamická měření – RMA	64
2.2.5.3	Závěry	68
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	70
3.1	Materiál	70
3.1.1	Příprava biologického materiálu	70
3.1.2	Experimentální měření 1. série	71
3.1.3	Experimentální měření 2. série	72
3.2	Metody	73
3.2.1	Měřicí aparatura RMA	73
3.2.2	Měřicí sestava pro 1. sérii měření	75
3.2.3	Měřicí sestava pro 2. sérii měření	77
4	KLINICKÁ ČÁST	79
4.1	Pilotní studie	79
4.1.1	Pacienti	79
4.1.2	Procedury	79
4.1.3	Metodika	80
4.2	Rozšířená studie	80
4.2.1	Pacienti	81
4.2.2	Procedury	82
4.2.3	Metodika	83
5	VÝSLEDKY	84
5.1	Výsledky experimentální části	84
5.1.1	Zpracování naměřených hodnot	84
5.1.2	Výsledky 1. série měření	86
5.1.3	Výsledky 2. série měření	88

5.2	Výsledky klinické části	95
5.2.1	Pilotní studie.....	95
5.2.1.1	Statistické vyhodnocení	95
5.2.1.2	Výsledky pacientů.....	95
5.2.2	Rozšířená studie	98
5.2.2.1	Statické vyhodnocení	98
5.2.2.2	Výsledky pacientů.....	98
6	DISKUZE.....	102
6.1	Experimentální část.....	102
6.2	Klinická část.....	104
7	ZÁVĚR.....	106
8	SEZNAM LITERATURY	109
9	PŘÍLOHY	117
9.1	Tabulky naměřených hodnot.....	117
9.2	Přehled publikovaných prací.....	130
9.2.1	Serum homocysteine levels in children and adolescents with impaired bone health	131
9.2.2	Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study	140
9.2.3	Denosumab a léčba osteoporózy – nové poznatky.....	144
9.2.4	Denosumab – významný pokrok v léčbě osteoporózy	147
9.2.5	Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost	150
9.2.6	Modern methods of characterization of mechanical properties of viscoelastic bodies and mechanical matching of artificial and biological materials.....	155

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1,25- DHCC	1,25-dihydroxycholecalciferol
24,25-DHCC	24,25-dihydroxycholecalciferol
25-HCC	25-hydroxycholecalciferol
ALP	Alkalická fosfatáza
BMD	Bone mineral density; denzita kostního minerálu
BMI	Body mass index; index tělesné hmotnosti
CTx	CrossLaps
DXA	Dual-energy X-ray absorptiometry; dvouenergievá rentgenová absorpciometrie
Hcy	Homocystein
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
lat.	latinsky
OC	Osteokalcin
PC	Personal computer; osobní počítač
PD	Paget disease; Pagetova nemoc
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kappa-B
Rtg	Rentgen
S-	Sérová hladina (např. S-ALP, S-Ca, S-CTx, S-Hcy, S-OC, S-P)
SD	Směrodatná odchylka
SERM	Selective estrogen receptor modulator; selektivní modulátor estrogenních receptorů
SW	Software
UK HK	Univerzita Karlova Hradec Králové
UV	Ultraviolet; ultrafialový
vz.	vzorek (kosti)

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Mechanické vlastnosti biologických struktur jsou nesporně důležité pro zdraví a pro funkceschopnost organismu. Zvlášť zřejmé je to v případě kardiovaskulárního systému a soustavy pohybové. Práce se zaměřuje v experimentální části na měření viskoelastických vlastností kostí (v našem případě kostí prasete domácího) a v klinické části na vliv aminokyseliny homocysteinu na kostní denzitu, která ovlivňuje pevnost a odolnost kostí. Obě části práce mají za cíl lépe poznat faktory, které ovlivňují nebo zvyšují riziko poškození kosti. Takovým poškozením může být např. fraktura.

Tradiční pojetí biomechaniky se zaměřovalo hlavně na problematiku pevnosti a pružnosti biologických struktur. Metody kvantifikace se obvykle omezovaly na moduly pružnosti, strain-stress křivky (tzv. zatěžovací diagramy) a na meze pevnosti biologických struktur a materiálů. Tyto parametry jsou však parametry statické (viz např. již starší studie: Valenta, Biomechanics, Academia, Prague, 1993). Experimentálně jsou totiž zpravidla měřeny statickými metodami. Navíc jsou založeny na předpokladu linearitý mechanického chování. Je zřejmé, že právě kosti jsou v reálných situacích namáhány převážně dynamicky. Jedním z cílů práce bylo ověření, zda mechanické chování kostí je lineární nebo nelineární.

Současný vývoj biomechaniky se zaměřuje na překonání těchto, často zásadních, omezení. Klasické metody jsou nahrazovány metodami, které studují jak statické, tak zejména dynamické chování biologických struktur a respektuje tak skutečnost, že jejich namáhání bývá zpravidla dynamické. Kromě toho moderní biomechanika studuje i linearitu mechanického chování. Nutno zdůraznit, že vývoj v této oblasti je rychlý a mnoho základních problémů není dosud uspokojivě vyřešeno. A to jak na teoretické úrovni, tak na úrovni experimentálních technik.

Po teoretické stránce jsou v současné době stále pro charakterizaci dynamického mechanického chování používány zejména tzv. komplexní moduly a komplexní tuhosti. Jedná se o zobecnění klasicky používaných modulů a tuhostí. Znalost těchto komplexních modulů a tuhostí umožňuje například řešit problematiku mechanické kompatibility biologických struktur a náhrad. Pod vlivem nemocí se komplexní tuhosti a komplexní moduly mění a mohou tak potenciálně sloužit jako diagnostický prostředek. Výše uvedené veličiny jsou výrazně závislé na věku a slouží tak jako markery biologického věku.

Pokrok v aplikaci těchto moderních přístupů brání špatná dostupnost vhodných měřicích metodik. Většina experimentálních pracovišť je tak odkázána na vlastní improvizace nebo na použití drahých a příliš robusních přístrojů typu DMA, které jsou nevhodné pro biologické a biomechanické laboratoře. Na biomechanickém pracovišti katedry biofyziky a fyzikální chemie se proto již několik let zdokonaluje soubor přístrojů pro měření komplexních modulů a tuhostí, který je založen na novém (rezonančním) principu měření. O aplikovatelnosti těchto přístrojů svědčí rostoucí zájem o spolupráci. V současné době katedra spolupracuje například s IKEM na měření biomechanických vlastností perikardu a srdečních chlopní. Cílem tohoto společného výzkumu je optimalizace mechanických vlastností náhradních chlopní. Rozvíjí se také spolupráce s Ústavem experimentální medicíny Akademie věd na vývoji nosičů pro náhradní materiály.

Dalším cílem práce bylo ověřit, zda kostní denzitu ovlivňuje vyšší hladina homocysteinu již v dětském věku. Narušení pevnosti kostí, tzn. mechanické odolnosti kostí je asi ze 70 % způsobeno sníženou kostní denzitou⁶⁷ neboli chorobou nazývanou osteoporóza.

Vztahem mezi vysokou hladinou homocysteinu v séru a nízkou denzitou kostního minerálu (BMD) a zvýšeným rizikem zlomenin u postmenopauzálních žen byla v uplynulé dekádě publikována řada prací⁴⁶⁻⁵⁴. V současné době existují pouze velmi omezené údaje týkající se vztahu mezi sérovou hladinou homocysteinu a kostním zdravím u dětí a dorostenců. Takovéto informace by byly velmi žádoucí vzhledem ke skutečnosti, že osteoporóza je považována za nemoc vyššího věku, zvláště pak za nemoc postmenopauzálních žen, která má ovšem své kořeny v dětství. Klinická část se dělí na pilotní a rozšířenou studii, ve kterých byly vyhodnoceny záznamy dětí a dorostenců vyšetřených v letech 2006 – 2012 v poradně pro dětskou osteologii Pardubické krajské nemocnice a.s.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika a vlastnosti kostí

2.1.1 Anatomie a fyziologie lidské kosti

Kost (lat. *os*) je tvrdá, mineralizovaná struktura sloužící jako mechanická ochrana vnitřních orgánů a opora těla, tvořící vnitřní konstrukci, na kterou se upínají svaly a šlachy³⁷. Lidská kost je součástí složitějšího systému zvaného lidská kostra (neboli skeleton). Představuje soubor kostí, chrupavek a vazů, které dohromady vytvářejí pevnou, pasivně pohyblivou oporu těla, na niž se upínají svaly. Kostrou tvořená ochranná pouzdra (lebka, hrudník) zároveň chrání některé klíčové orgány před zraněním. Lidská kostra tvoří cca 14 % tělesné hmotnosti. Kostra dospělého člověka se skládá přibližně z 206 kostí, nicméně toto číslo je poměrně individuální a závisí například na dědičných predispozicích, ale především na věku. Například novorozenec má asi 270 kostí, toto číslo se po narození ještě nějakou dobu zvyšuje tak, jak vznikají některé nové kosti, nicméně u adolescentů počet kostí strmě klesá, protože jich řada srůstá. Lidská kostra se dá obecně rozdělit na tyto části: páteřní sloupec, křížová kost a kostrč – 26 kostí, lebka – 8 kostí, obličej – 14 kostí, sluchové kůstky – 6 kostí, jazyk, žebra a kosti hrudní – 26 kostí, horní končetiny – 64 kostí, dolní končetiny – 62 kostí. Kosti mají své vlastní cévní zásobení a obsahují četná nervová zakončení^{19,36}.

Dle tvaru se rozeznávají tzv. *dlouhé kosti* (např. stehenní, holenní, loketní, vřetenní) s tělem a s charakteristicky odlišnými kloubními úseky na obou koncích. Dále *krátké kosti* (zápěstní a zanártní kost) nepravidelného tvaru s nepravidelnými kloubními plochami různých tvarů a ploché kosti (žebra, hrudní kost, lebeční kosti, lopatka). *Kosti nepravidelné* jsou sedací, stydká kost a obratel¹⁹.

Kosti všech tvarových typů jsou tvořeny kostní tkání dvou hlavních forem. Je to kostní tkáň hutná – kompakta, která tvoří vnější povrch kostí (corticalis) a houbovitá kostní tkáň – spongióza (kostní trámčina), která je v nitru kostí¹⁹.

Dlouhé kosti mají duté tělo tvořené silným pláštěm kompaktní kosti. Kloubní konce dlouhých kostí jsou na povrchu tvořeny tenčí vrstvou kompaktní kosti, uvnitř pak

spongiózní kostí. Trámečky typicky začínají z kompakty v konci těla kosti. Dutina těla dlouhé kosti obsahuje kostní dřev¹⁹.

Krátké kosti mají na povrchu tenkou vrstvičku kompakty, uvnitř je spongióza, která je pod povrchem hustší. Ploché kosti mají na zevním a vnitřním povrchu vždy vrstvu kompakty a mezi oběma je spongióza, nazývaná diploe¹⁹.

Kostní dřev vyplňuje dřevnou dutinu v tělech dlouhých kostí a dále všechny prostory mezi trámečky spongiózy. Červená kostní dřev je orgánem krve tvorby. Skládá se ze sítě retikulárního vaziva protkaného krevními vlasečnicemi. V okách retikulárního vaziva je krevtovná tkáň obsahující mateřské výchozí buňky pro tvorbu červených krvinek, pro granulocyty a část lymfocytů a pro krevní destičky. Za růstového období je retikulární vazivo dřevě postupně prostupováno tukovými buňkami. Ve věku kolem 20 let je již žlutá dřev ve dřevných dutinách všech dlouhých kostí, s výjimkou proximálního konce kosti pažní a stehenní, spongiózy kloubních kostí dlouhých a krátkých kostí (obratle, zápěstí – karpální, kosti zanártní – tarzální), v žebrech, v kostech pánevních, v kosti hrudní a v diploe plochých lebečních kostí, kde se udržuje krevtovná tkáň – dřev červená. Šedá dřev kostní, želatinovitého, průsvitného vzhledu, vzniká ze žluté dřevě ztrátou tuku. Je to jev typický pro pozdní věk¹⁹.

Okostice (periost) je vazivový obal, kryjící povrch kostí všude s výjimkou, kdy kost je spojena se svalem a mimo kloubní konce kosti, jež jsou kryty chrupavkou. Okostice proniká kolagenními vlákny své hluboké vrstvy do kosti (vlákna Sharpeyova) a jimi je periost fixován ke kosti. Zevní vrstva okostice je složena z hustšího vaziva se snopci vláken spíše podélně uloženými. Hlubší vrstva, zvaná kambiová, obsahuje více vazivových buněk a nepravidelně uspořádaná vlákna, z nichž část proniká do kosti ve formě vláken Sharpeyových. Obsahuje četné cévy, jež z periostu pronikají do kosti Volkmannovými kanálky. V růstovém období a za regenerace poškozené kosti obsahuje kambiová vrstva periostu též osteoblasty (buňky vytvářející kostní tkáň) ve vrstvičce, přiložené k povrchu kosti. Jejich činností přirůstá kost apozičně (tvoření vrstev) do tloušťky a do této přibývající kosti jsou z periostu zaujímana Sharpeyova vlákna. Na vnitřní ploše kosti, mezi kostní tkání a kostní dřeví, je vazivová vrstvička podobná periostu, nazývaná endost. Endost je mnohem tenčí, jeho význam pro výživu kosti i pro regeneraci je menší než význam okostice¹⁹.

Kost zajišťuje některé mechanické a fyziologické funkce, tvoří podpěrný systém těla vůči vnějším silám (gravitace), pákový systém pro přenos sil (např. svalových sil), ochranu pro životně důležité vnitřní orgány (např. mozek), krvetvorbu (hemopoézu) a účastní se ukládání a udržení rovnováhy vápníku (homeostáza minerálů). Kostní skelet obsahuje 99% veškerého vápníku v těle dospělého jedince, tj. přibližně 1 kg vápníku, a pro jeho výměnu má skelet k dispozici $1,2 \cdot 10^3 \text{ m}^2$ povrchu¹⁹.

Kosti jsou složeny z 1/3 organickými látkami (buňky a matrice), 2/3 z anorganických látek (minerální složky).

Organické látky:

- kolagen I. typu – 90 % všech organických sloučenin kosti, tvořen trojitou šroubovicí ze tří α -helixů s příčnými můstky, celý komplex dotvářen extracelulárně
- osteokalcin – je produkován osteoblasty, jeho zvýšená přítomnost v krvi signalizuje vyšší metabolický obrat kosti
- osteonektin, osteopontin, proteoglykany, sialoproteiny – funkce těchto proteinů není dosud plně objasněná

Anorganické látky:

- 85 % – krystaly fosforečnanu vápenatého ve formě krystalů hydroxyapatitu
 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$
- 10 % – uhličitan vápenatý
- 0,3 % – fluorid vápenatý
- 1 % – fosforečnan hořečnatý

Minerály tvoří krystaly tvaru jehly nebo plátů a jsou lokalizovány mezi kolagenními fibrilami^{1,3}.

2.1.2 Anatomie a fyziologie kosti prasete domácího

Pro experimentální část této práce byla zvolena kost prasete domácího. Lidská kost je pro experimentální účely obtížně dostupná, a to především z etických důvodů.

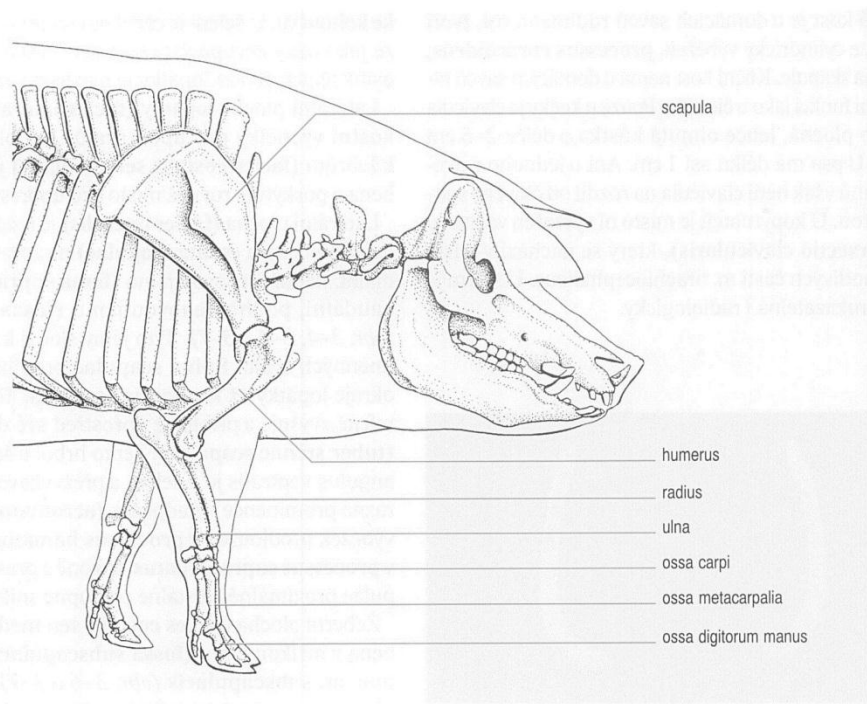
Z experimentálního hlediska je důležitá informace, že *post mortem* (posmrtné) detekované mechanické vlastnosti neodpovídají mechanickým vlastnostem živé tkáně. Vždy se jedná o různě přesné přiblížení. Při odhadu reálných vlastností je pak nutné vzít v úvahu dobu mezi měřením a odebráním vzorků, způsob skladování vzorků, jejich teplotu při testování apod.²³

Kost prasete domácího je kosti lidské pravděpodobně nejpodobnější, a to ve všech charakteristických vlastnostech a fyziologických funkcích. Je vhodná jako model pro napodobování vnitřních poměrů u člověka. Tohoto faktu využívá i pracoviště experimentální medicíny pražského IKEM, který používá prasata domácí pro lékařské a výzkumné účely. Lékaři se na nich učí nové metody operací ještě předtím, než jsou použity v humánním lékařství. Pro experimentální účely se používají především göttingenská miniprasata (angl. Göttingen minipigs), která jsou výrazně menší a lehčí než prase domácí, nicméně stavbou a funkcí člověku stejně blízká jako prase domácí^{14,31}.

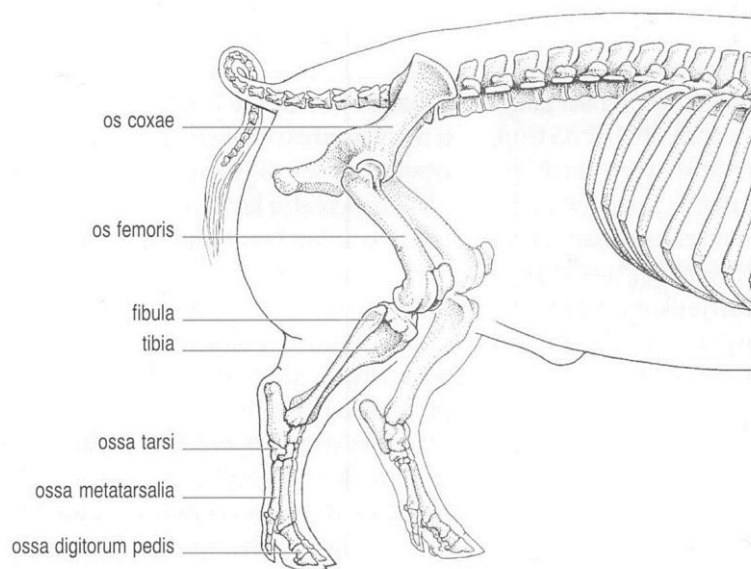
Prase domácí je sudokopytník, jehož končetiny se dělí na přední, neboli hrudní (membra thoracica), a na zadní, neboli pánevní (membra pelvina)¹⁸.

Fylogeneticky je na hrudní končetině domácích savců založeno pět prstů (digiti manus). Jejich počet je však od mediální (I. prst) k laterální straně (V. prst) druhově specificky redukován. U prasete jsou vytvořeny pouze čtyři prsty (II. až V. prst). Třetí a čtvrtá metakarpální kost je silná, druhá a pátá jsou menší a slabší, jsou základem pro tzv. paprst – paradigitus¹⁸.

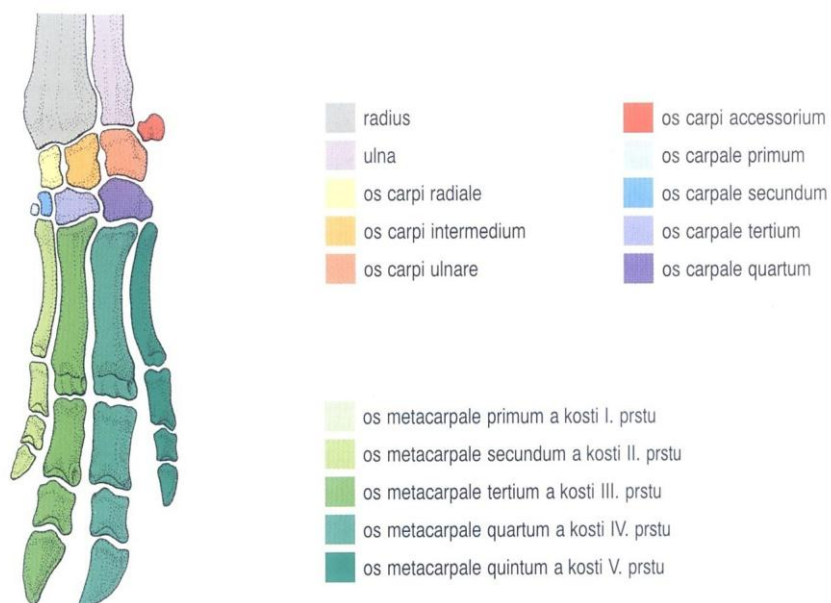
Kostra nártu a prstů pánevní končetiny odpovídají v podstatě hrudní končetině. Existují zde však jemné rozdíly. Kostí metatarzu jsou na rozdíl od metakarpu štíhlejší, delší a mají silnější stěnu¹⁸.



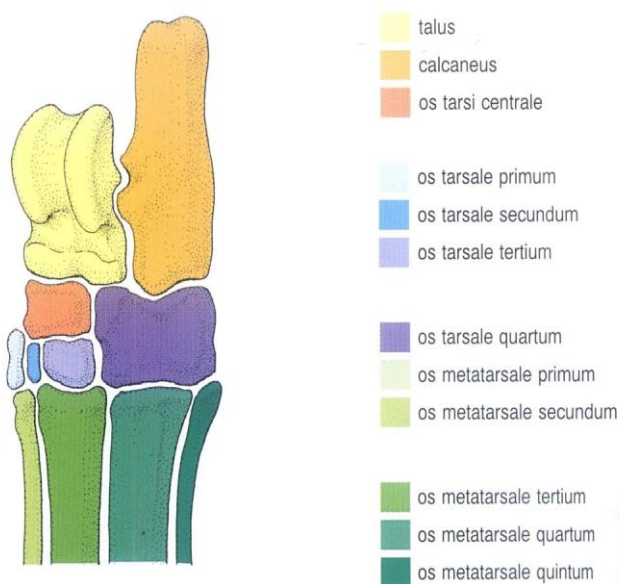
Obr. 1: Prase domácí – hrudní končetiny¹⁸



Obr. 2: Prase domácí – pánevní končetiny¹⁸



Obr. 3: Prase domácí – schematické zobrazení kostry hrudní končetiny¹⁸



Obr. 4: Prase domácí - schematické zobrazení kostry hlezna¹⁸

2.1.3 Vývoj a růst lidských kostí

Kosti se začínají formovat u embrya, v šesti týdnech jsou tvořeny z vaziva a hyalinních (sklovitých) chrupavek. Proces osifikace, tedy kostnatění, začíná již během nitroděložního vývoje a pokračuje po narození až do konce adolescence, kdy zanikají růstové štěrbinové dýchávkové kostí a vývoj kostí je dokončen³⁶.

V embryonálním vývoji a v průběhu růstu se u člověka zachoval dvojí způsob tvorby kostí. Osifikace (kostnatění, tvorba kostní tkáně) z vaziva, tzv. **osifikace desmogenní** a osifikace z chrupavky – **osifikace chondrogenní**. Osifikace chondrogenní může být ještě dvojího typu – povrchová osifikace z perichondria (povrchová vrstva chrupavky), tzv. – **osifikace perichondrální**, a uvnitř ve chrupavce – **osifikace enchondrální**. Osifikací enchondrální osifikuje většina kostí skeletu člověka, např. dlouhé kosti, obratle, kosti pletence hrudního a pánevního, kosti baze lebny atd. Osifikace je proces dlouhodobý, který se zastavuje po dosažení potřebné délky a tvaru kosti. V průběhu dětství je kostní tkáň modelována, kdy kostní formace převažuje nad kostní resorpcí. V dospělosti již následuje dynamická přestavba (remodelace) kosti, která se přizpůsobuje vnějším fyzikálním vlivům (namáhání při zátěži), hmotnosti těla a vnitřním poměrům v organismu. Za normálních okolností se ročně přestavuje asi 5–10 % lidské kostry^{19,36}.

Enchondrální osifikaci lze dobře objasnit na osifikaci dlouhých kostí. Chrupavka tvoří model, který základním tvarem odpovídá budoucí kosti. Chrupavčitý základ je na povrchu kryt perichondriem bohatým na buňky embryonálního vaziva. Tvorba kosti začíná v pruhu perichondria, který obklopuje střed chrupavky. Osteogenní aktivita se projevuje zpočátku vznikem tenkého prstence, který postupně zesiluje a vytváří periostální kost, vzniklou na podkladě vaziva osifikací desmogenní. Současně s tím se postupně mění vnitřní struktura chrupavky. Do této změněné chrupavky pronikají od kostěného pláště z kambiové vrstvy periostu pupeny embryonální tkáně s cévami. Z těchto pupenů se diferencují buňky primitivní kostní dřevě a osteoblasty vytvářející enchondrálně kostní tkáň. Toto primární osifikační jádro je tvořeno hypertrofickou zvápenatělou chrupavkou. Rozrušením centra zvápenatělé chrupavky vzniká primární dřevěná dutina s cévami a embryonálním vazivem. Touto osifikací vzniká střední část dlouhé kosti, nazývaná diafýza. Souběžně s tímto procesem dochází k zesílení periostální kosti, která se rovněž šíří směrem k epifýzám¹⁹.

V perinatálním období vznikají rovněž osifikační centra v epifýzách dlouhých kostí, která se šíří všemi směry. Chrupavka zůstává zachována jen v oblasti kloubní chrupavky a v podobě růstových chrupavek mezi epifýzou a diafýzou. Z růstových chrupavek přirůstá dlouhá kost do délky (echondrální osifikace). Na konci růstového období ustává novotvoření (proliferace) chondrocytů v růstové chrupavce, která je nahrazena spongiózou a kostní dřeví. Po „uzávěru“ růstové chrupavky končí růst dlouhých kostí do délky¹⁹.

Do tloušťky přirůstá dlouhá kost z periostu, místy z endostu, mechanismem apozice. Pro vývoj tvarů je apozice doplněna odbouráváním kosti, tj. rezorpcí na některých místech, a to jak z periostu, tak z endostu. Perichondrální, později periostální desmogenní osifikací vytvořený, plášť představuje primární kompaktu. Primární kompakta diafýzy dlouhé kosti je složena z vláknité kosti, kde kolagenní vlákna jsou náhodně orientována. Ve věku (14 až 16) let se u člověka již nevyskytuje. Mineralizace vláknité kosti má náhodný charakter a může docházet i k hypermineralizaci. Vláknitá kostní tkáň vytváří nosnou „strukturu“ pro primární lamelózní kostní tkáň¹⁹.

Primární lamelózní kost je uspořádána v kruhových prstencích kolem nitroskeletního (endostálního) a okostičního (periostálního) povrchu kosti. Trámečky v epifýze dlouhých kostí jsou rovněž primární lamelózní kostí a jsou v blízkém kontaktu se dřeví a vaskulární tkání. Tato okolnost umožňuje rychlou výměnu vápníku mezi kostní tkání a krevním sérem, což pravděpodobně svědčí o tom, proč spongióza je jedna z prvních struktur, která prokazuje osteoporózu. Mechanická únosnost je dostatečná. Biosystém ovšem v této fázi dává přednost hematopoéze a metabolismu minerálů¹⁹.

Kvalitně organizovaná primární lamelózní kost obsahuje rovněž primární osteony, což jsou soustředěné prstence kolem malých vaskulárních kanálků. Jsou vývojově, morfologicky a mechanicky odlišné od sekundárních osteonů, neboť nemají tmelovou linii, což je tenká vrstvička, která odděluje lamely od sebe, a obsahují menší počet lamel než sekundární osteon¹⁹.

Pleteňovitá kost, podobně jako primární lamelózní kost, se vyvíjí na již existujícím povrchu. Tvoří se rychle a vyskytuje se jako dobře orientovaná spongiózní kostní tkáň se zesílenými trámečky ve tvaru plotének vytvořených vrstvením (apozicí) na endostálním nebo periostálním povrchu. Tento typ kostní tkáně je nejběžnějším u rychle rostoucích

velkých zvířat, jako je hovězí dobytek. Ovšem pleteňovitá kostní tkáň byla rovněž pozorována u dětí v období ukončování svého růstu¹⁹.

Desmogenní osifikace probíhá novotvorbou kostních trámečků přímo ve vazivu. Takto osifikují klenby lebeční, kosti obličejové části lebky a většina kosti klíční¹⁹.

Osifikace krátkých kostí, jež nemají diafýzu a epifýzu, probíhá výhradně enchondrálně uprostřed chrupavčitého základu. Odtud se osifikace šíří k povrchu kosti po celé růstové období. Teprve na konci růstového období se vytváří plášt'ové lamely, jež vytvoří tenkou povrchovou kompaktu kosti¹⁹.

Cévní zásobení dlouhých kostí má několik zdrojů. Vyživující tepna (a. nutricia) se po vstupu do kosti svými větvemi dostává do kostní dřene, kterou vyživuje, a částí svých větví se napojuje na cévy v kostní tkáni. Největší množství cév do kosti přichází z okostice periostální cévy. Bohatě jsou mezi sebou propojeny (anastomozují) a do kosti vstupují šikmými drobnými Volkmannovými kanálky. Samostatnými cévami je zásoben konec diafýzy, který se nazývá metafýza. Epifýzy dlouhých kostí odvádějí krev z kostí jednak podél tepének, jednak samostatnými kanálky¹⁹.

Sekundární kostní tkáň – jestliže kostní tkáň je produktem procesu odbourávání dříve existující kostní tkáně a následné novotvorby kostní tkáně, která resorbovanou kost nahrazuje, pak se mluví o sekundární kostní tkáni. Např. u lidské kompakty je výsledkem procesu odbourávání kosti pomocí osteoklastů a následně novotvorby kosti pomocí osteoblastů, tzv. sekundární osteon. Sekundární osteon má centrální vaskulární kanálek o větší světlosti než má primární osteon a nazývá se Haversův kanálek. Kanálky se volně spojují (anastomozují) příčnými šikmými spojkami. Z povrchu periostálního i endostálního vnikají šikmo nebo radiálně do kosti kanálky Volkmannovy a komunikují s kanálky Haversovými. Existuje tak v kosti souvislý složitý systém kanálků s krevními a lymfatickými cévami a nervy. Haversův kanálek je obklopen řadou lamel v počtu 8 – 20, které obsahují dospělé kostní buňky – osteocyty, umístěné v dutinách, zvané lakuny. Z lakun se šíří řada tenkých kostních kanálků, jimiž osteocyty získávají výživné látky. Lakuny a kanálky kostní jsou vystlány zvláštním organickým cementem, který neobsahuje fibrily. Lamely, osteocyty v lakunách a centrální kanál tvoří Haversův systém či osteon, což je strukturní jednotka kompaktní kosti. Haversův kanál je vyplněn řídkým kolagenním vazivem. Difúze látek probíhá přes krevní kapiláry uložené v tomto vazivu a kostními kanálky. Mezi přilehlými osteony je tenká vrstvička zvaná tmelová výstelka. Prostory mezi

Haversovými systémy jsou vyplněny v mezeře lamelami, což jsou zbytky starších, později rozrušených Haversových lamel, uložených mezi novějšími kompletními osteony. Tyto lamely vznikají přestavbou lamelozní kosti. V kompaktě lidských kostí jsou úplné a pravidelné osteony dosti vzácné¹⁹.

Lamely povrchové – lemují kost rovnoběžně se zevním i vnitřním povrchem. Vznikají opět mechanismem apozice. Osteoblasty, jež povrchové lamely kosti vytvářejí, patří kambiové vrstvě okostice¹⁹.

V mládí jsou dlouhé kosti tvořeny vláknitou kostí s několika primárními osteony. V průběhu dospívání vláknitá kost přechází na lamelozní kostní tkáň a v dospělosti je částečně remodelována na Haversovu kost. Ovšem Haversova kost není nikdy primární, ale je tvořena následně po proniknutí endostálních kapilár do nevasculární kosti. Přestože Haversova kost má nižší mechanické vlastnosti než kost lamelozní, dochází s věkem k její převaze nad kostí lamelozní¹⁹.

Spongióza tvoří asi 20 % skeletu a její prostorová struktura je tvořena zdánlivě neuspořádanou spleť trámečků, které probíhají ve směru působících tahových a tlakových napětí. Jednotlivé trámečky jsou v důsledku remodelace (odbourání a novotvorba kostní tkáně) a stárnutí složeny z různých typů mineralizovaných lamel. Při nízkých hustotách kostní tkáně jsou komůrky tvořeny otevřenou sítí prutů, kdežto při vyšší hustotě struktura přechází v uzavřenou síť plotének. Například u obratlů vytvářejí trámečky sloupcovitou strukturu „válečků“, které jsou převážně orientovány ve vertikálním směru, což v tomto směru zajišťuje požadovanou tuhost a pevnost¹⁹.

Trámce spongiózní kosti jsou složeny z řady více nebo méně rovnoběžných lamel. V lamelozní kostní tkáni je vzdálenost mezi každým systémem cévních trubic asi 200 nanometrů. Architektonika spongiózní kosti není vytvořena od počátku. Vyvíjí se vlivem tlaků a tahů¹⁹.

Mikrostruktura kostní tkáně – na molekulární úrovni je kostní tkáň tvořena maticí, složenou z krystalické minerální fáze, která se složením podobá hydroxyapatitu a karbonátapatitu a z amorfni a krystalické fáze fosforečnanu vápenatého. Krystaly apatitu jsou uloženy na kolagenních fibrilách jako štíhlé jehlice. Dlouhá osa krystalů apatitu je orientována rovnoběžně s dlouhou osou kolagenních molekul. Mezi vlákny kolagenu je amorfni hmota mukopolysacharidů a glykoproteinů. Na různé organické komponenty je vázána též voda, která značně ovlivňuje mechanické vlastnosti kosti. Za odbourávání,

novotvorbu a zachování kostní tkáně jsou spoluzodpovědné čtyři kostní buňky. Tři z nich pokrývají kostní tkáně a jsou to osteoblasty, povrchové kostní buňky a osteoklasty. Čtvrtý typ buněk osteocyty jsou v podstatě osteoblasty, které se postupně zalily produkovanou kostní maticí¹⁹.

- Osteoblasty – jsou osteoformační buňky umístěné na aktivním kostním povrchu, což může být okostice (vnější povrch kosti) nebo vnitřní (endosteální) povrch kosti. V prvním případě jsou osteoblasty částí vnitřní buněčné vrstvy periostu, ležící mezi vnějším povrchem kosti a hustou vnější vazivovou membránou. Aktivita těchto osteoblastů způsobuje změnu tvaru kosti. V druhém případě jsou osteoblasty lokalizovány mezi povrchem kosti a prvky kostní dřene nebo cévními kanálky v kostní tkáni. Tyto osteoblasty způsobují změnu hustoty kostní tkáně. Osteoblasty hrají důležitou roli i při odbourávání kosti. Mají povrchové receptory pro endokrinní a parakrinní faktory, které stimulují osteoblasty k aktivaci kolagenázy (enzymového odbourávání kolagenu), což přitahuje osteoklasty. Při ukončení aktivity osteoklastů, mohou růstové faktory osteoblastů nebo makrofágů právě v oblasti odbourávání stěny lakuny být mechanismem, nutným pro tvorbu kostní tkáně spolu s osteoklastickou resorpcí lakuny¹⁹.
- Povrchové kostní buňky „tapetové buňky“ – jsou ploché klidové buňky umístěné na nečinném povrchu kosti, což je asi 80 % povrchu dospělé trámčité a kompaktní kosti. Tyto buňky se tvoří diferenciací osteoblastů, jsou rozšířeny v tenké vrstvě. Povrchové kostní buňky odděluje od mineralizované kosti vrstva pojivové tkáně. Pomocí styčných spár jsou tyto buňky spojeny jedna s druhou a s osteoblasty. Vrstva těchto buněk vytváří membránu, která odděluje vázanou vodu kostí od vmezeřených kapalin. Povrchové kostní buňky normálně neprojevují mitotickou aktivitu (nepřímé dělení buňky). Vhodnou stimulací mohou být aktivovány a stávají se opět vrstvou osteoblastů¹⁹.
- Osteoklasty – jsou mnohjaderné buňky zodpovědné za odbourávání kosti, a to od povrchu nebo z nitra kanálku a uvolňují vápník do séra. Nacházejí se na povrchu kosti, který byl v různém čase obsazen osteoblasty nebo povrchovými kostními buňkami. Osteoklasty jsou charakterizovány přítomností početných lysozómů (částice uvnitř buňky, obsahující

hydrolytické enzymy), které slouží k enzymatickému odbourávání různých látek včetně části cytoplasmy vlastní buňky. Jak mezi osteoklasty, tak s osteoblasty a ostatními buňkami není vytvořen žádný kontakt. Tyto buňky nejsou součástí sítě kostních buněk. Vzájemné spojení s osteoblasty se pravděpodobně uskutečňuje nepřímo chemickými prostředníky, což jsou parakrinní faktory vylučované osteoblasty nebo vazebné faktory kostní matrice, které jsou uvolňovány kolagenázovou aktivitou osteoblastů, když iniciují resorpci kosti¹⁹.

- Osteocyty – jsou kostní buňky, které jsou uzavřeny v kostní matrici. Reprezentují malou skupinu osteoblastů, které podstoupily konečnou diferenciaci (získání alespoň jednoho povrchového antigenu, který není sdílen osteoblasty). A jsou ponechány v nově tvořené kostní matrici. Jsou umístěny v lakunách a udržují kontakt s ostatními osteocyty, osteoblasty a povrchovými kostními buňkami prostřednictvím buněčných výběžků, procházejících kostními kanálky. Osteocyt je zodpovědný za zachování kostní tkáně a podílí se rovněž na regulaci vápníku v tělních tekutinách. Osteocyt má schopnost přetvářet se na osteoblast, osteoklast či dokonce na retikulární buňku¹⁹.

2.1.4 Metabolismus kostí

Kostní metabolismus je kontinuální a dynamický proces, který udržuje velmi těsnou rovnováhu mezi procesem tvorby nové kosti a odbourávání kosti staré²⁹. Za normálních podmínek se tímto rovnovážným procesem, nazývaným také remodelace, u člověka obmění 5–10 % kostní hmoty za rok. Maxima kostní hmoty, hustoty a kostního obratu dosahují lidé kolem věku 25 let, po 30. roce života dochází k postupnému úbytku (cca 0,5 % za rok)¹⁷.

Remodelace je důležitá pro udržení strukturní integrity kostry a slouží zároveň k udržení homeostázy vápníku a fosforu v těle. Remodelační cyklus se může spustit vlivem změn působení mechanických sil, mikrotraumatem, metabolickým či nutričním stresem a hormonální odezvou na změny hladin vápníku a fosforu. Je to přísně regulovaný sled fází, závislý na interakci mezi dvěma buněčnými liniemi – mesenchymální osteoblastovou linií a hematopoetickou osteoklastovou linií¹⁷.

V remodelaci se vždy střídají dva děje: resorpce a po ní tvorba kostní hmoty. Tyto dva procesy se vyskytují na jednom místě a dochází k nahrazení stejného množství hmoty, které bylo resorbováno. Remodelační cyklus se dělí na následující fáze: klidový stav, aktivace, resorpce, formace, mineralizace. Faktory, které iniciují vstup z *klidové* fáze do *aktivační*, nejsou zatím zcela známy, ale předpokládá se, že se zde významně uplatňují osteocyty¹⁷.

Aktivační fáze zahrnuje kontakt progenitorových buněk osteoklastů s osteoblasty. Pod vlivem cytokinů a růstových faktorů dojde k diferenciaci, migraci a fúzi osteoklastových prekurzorů a k tvorbě velkých mnohojaderných osteoklastů. V *resorpční* fázi přilnou tyto buňky k povrchu kosti, následuje iniciace resorpce, sekrece hydrogenových iontů a lysozomálních enzymů (především katepsinu K), které mohou degradovat všechny komponenty při nízkém pH. Výsledkem resorpce jsou nepravidelné kavity na povrchu kosti. Také růstové faktory (např. TGF β , PDGF, IGF-I a II), které jsou obsaženy v matrix, jsou uvolňovány a chemotakticky přitahují v další fázi preosteoblasty. Pak dochází ke zvratu, kdy se postupně aktivují osteoblasty a během fáze *formování* jsou kavity kompletně po vrstvách vyplněny matrix. Závěrečná *mineralizační* fáze začíná přibližně 30 dní po syntetizování osteoidu. Mineralizace trabekulární kosti trvá 90 dní a kortikální kosti 130 dní¹⁷.

Těsná rovnováha mezi kostní novotvorbou a odbouráváním je řízena celou řadou endokrinních a parakrinních faktorů:

- Endokrinní: Parathormon, Vitamin D, Kalcitonin, Vitamin K, Tyreoidální hormony, Estrogeny, Androgeny, Kortikoidy, Inzulin, Fosfatoniny
- Parakrinní: Interleukin 6, Systém regulační (OPG-RANKL-RANK), TNF faktory (I. rodina cytokinů), TGF faktory (TGF-alfa), IGF faktory (IGF-I a IGF-II), CSF faktory²⁹.

Rovnováhu vápníku ve skeletu zabezpečují tyto endokrinní hormony jako je parathormon, kalcitonin, cholekalciferol (vitamin D), jakož i rozmnožovací a růstové hormony.

Parathormon je hormon, který produkují příštítná tělíska štítné žlázy a který reguluje metabolismus vápníku (zvyšuje hladinu vápníku v krevní plazmě)¹⁹. Parathormon zvyšuje aktivitu osteoklastů, osteocytů a také osteoblastů. Hlavním efektem PTH na kost je

mobilizace vápníku odbouráváním kostní substance osteoklasty. Zvýšením aktivity osteoblastů zasahuje PTH i do syntézy kolagenu⁷.

Kalcitonin je vylučován parafolikulárními buňkami štítné žlázy a naopak od parathormonu snižuje hladinu vápníku v krevní plazmě¹⁹. Kalcitonin tlumí osteoresorpci, jeho sekreci pozitivně ovlivňují estrogeny. Za gravidity je nadprodukce kalcitoninu, což má za následek inhibici odbourávání kostní tkáně (kalcitonin je „ochráncem“ skeletu mateřského organismu)⁷.

Aktivní metabolity vitamínu D – vitamin D je v organismu savce postupně hydroxylován na mono-, di-, a trihydroxymetabolity. K hydroxylaci dochází v různých orgánech a vzniklé metabolity mají odlišné biologické účinky. Pro metabolismus kostí jsou důležité:

25-monohydroxymetabolit (25-hydroxycholecalciferol, 25-HCC),

24,25-dihydroxymetabolit (24,25-dihydroxycholecalciferol, 24,25-DHCC),

1,25-dihydroxymetabolit (1,25-dihydroxycholecalciferol, 1,25-DHCC)

Pro mineralizaci osteoidu je podstatné, že tyto metabolity jsou v krevní plazmě ve stálém poměru (1000:100:1)⁷.

25-monohydroxymetabolit vzniká hydroxylací v játrech a je meziproduktem pro další hydroxylaci. Jeho jediným efektem je stimulace kostní mineralizace. Z jater je transportován α -globulinem k místu další metabolizace, tj. k ledvinách⁷.

1,25-dihydroxymetabolit je nejúčinnější metabolit vitamínu D, má všechny vlastnosti hormonu (označován také D-hormon): vysokou afinitu, cílený účinek, specifčnost a specifickou kontrolu syntézy. Vzniká hydroxylací 25-HCC v ledvinách. Jeho tvorba je stimulována parathormonem a inhibována kalcitoninem nebo deficitem hořčičku. V kosti zvyšuje osteoresorpci, dále tlumí syntézu kolagenu, zvyšuje obrat vápníku v kostním minerálu⁷.

24,25-dihydroxymetabolit vzniká také v ledvinách namísto 1,25-DHCC, a to za určitých podmínek, např. při hypokalcemii. 24,25-DHCC stimuluje osteoblasty, a tedy novotvorbu kosti. Tlumí sekreci PTH a tím snižuje osteoresorpci⁷.

2.1.5 Vybraná metabolická onemocnění kostí

Metabolická onemocnění kostí se většinou týkají kostí jako celku. Může být postižena buď organická složka kostní tkáně, nebo kostní minerál, nebo obojí. Na prvním místě četnosti výskytu stojí osteoporóza, ale k častým metabolicky podmíněným chorobám patří i osteomalacie a Pagetova kostní choroba⁹.

2.1.5.1 Osteoporóza

Osteoporóza je generalizované onemocnění skeletu charakterizované progredujícím úbytkem kostní hmoty na jednotku objemu se zhoršením mikroarchitektury kostní tkáně, vedoucí ke zvýšené kostní fragilitě a následnému zvýšení rizika fraktury. O manifestované osteoporóze lze hovořit při výskytu jedné nebo více osteoporotických zlomenin. Zejména zlomeniny obratlů a krčku stehenní kosti významně zhoršují kvalitu života a zkracují jeho délku³⁰. Vzhledem k tomu, že osteoporóza postihuje 7–8 % obyvatel vyspělých zemí, lze hovořit o významném problému medicínském, sociálním, lidském a ekonomickém. Právem je považována za „civilizační chorobu“ dnešní doby. Faktory zvyšujícími riziko osteoporózy a zlomeniny jsou nezdravý životní styl, snížený příjem kalcia a vitamínu D, fyzická inaktivita, kouření, negativní vlivy životního prostředí a další rizikové faktory. Zásadní význam má též období dětství a dospívání, kdy se buduje skelet a svalová tkáň²⁰. Je všobecně známo, že v období mezi 20. - 80. rokem života ztrácí člověk až polovinu své kostní hmoty, a v této souvislosti byl zmiňován úbytek trámčité kosti. Relativní ztráta kostní hmoty s věkem je markantnější v trabekulární kosti, protože ta má vyšší poměr povrch/objem. Absolutní úbytek kostní hmoty je však vyšší v kortikální kosti, což významně přispívá k poklesu mechanické odolnosti kostní tkáně. Nedávno publikované studie prokazují, že kortikální kost má zásadní význam pro integritu skeletu a pevnost kortikální kosti je rozhodujícím faktorem pro vznik zlomeniny. S přibývajícím věkem dochází k úbytku kortikální hmoty, zejména v důsledku jejího ztenčení a nárůstu porozity kortikální kosti⁶⁹.

Preventivní opatření (fyzická aktivita, strava bohatá vápníkem a vitamínem D) jsou proto v období dětství a dospívání velmi důležité. Osteoporóza bývá nikoliv neprávem nazývána pediatrickou chorobou s geriatrickými důsledky. Základem terapie osteoporózy zůstává aktivní spolupráce pacienta, přiměřený pohyb se zátěží skeletu a zdravá životospráva. Nezbytnou součástí jakékoliv terapie osteoporózy je dostatečná saturace

vápníkem a vitamínem D. K farmakologické léčbě postmenopauzální osteoporózy se přistupuje u žen s denzitometricky dokumentovanou osteoporózou, kdy denzita kostního minerálu vyjádřená pomocí T-skóre je - 2,5 SD a méně. Terapie je rovněž určena ženám se sníženou denzitou kostního minerálu, které utrpěly osteoporotickou zlomeninu, a zvažuje se u žen se sníženou denzitou kostního minerálu a současnými hlavními rizikovými faktory osteoporózy²⁰.

Léčivé přípravky v terapii osteoporózy

Cílem farmakologické léčby osteoporózy je zabránit zlomeninám, udržet množství a kvalitu kostní tkáně nebo dosáhnout jejich úpravy, zmírnit klinické důsledky fraktur a deformit skeletu, zachovat tělesnou zdatnost a snížit riziko pádů³⁰.

Léčivé přípravky registrované pro terapii osteoporózy lze rozdělit na osteoformační (osteoanabolické) a antiresorpční (antikatabolické).

- **Osteoanabolické přípravky** indukují nárůst množství kostní hmoty, čímž stoupá převaha kostní novotvorby nad osteoresorpcí²¹. Osteoanabolická léčiva snižují riziko zlomenin. Uvedená kritéria splňuje rekombinantní *parathormon* a rekombinantní analog parathormonu *teriparatid*. *Stroncium ranelátu* se přičítá duální mechanismus účinku (efekt antiresorpční i formační). Jeho užívání vede k významnému nárůstu BMD a ke snížení rizika zlomenin³⁰.
- K farmakoterapii se nejčastěji používají léčiva působící antiresorpčně (antikatabolicky)³⁰. Mezi **antikatabolické přípravky** patří bisfosfonáty (*alendronát, risendronát, ibandronát, zolendronát*), selektivní modulátory estrogenních receptorů (SERM; *raloxifen, bazedoxifen, lazofoxifen*), *kalcitonin* a *denosumab*. Antikatabolické přípravky snižují kostní remodelaci, prodlužují životnost kostních strukturálních jednotek, čímž se prodlužuje doba, během níž dochází k akumulaci kostního minerálu, a tím stoupá kostní mineralizace²¹.

Bisfosfonáty, které jsou hlavními reprezentanty antikatabolických přípravků, snižují dozrávání a počet osteoklastů a vedou k jejich apoptóze, tlumí též kostní formaci a jsou celoživotně deponovány v kostní matrix²¹.

Významný předěl v léčbě osteoporózy představuje zavedení denosumabu. Je to plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která má vysokou afinitu k RANKL (ligand

receptoru aktivujícího nukleární faktor kappa-B), čímž inhibuje diferenciaci osteoklastů, jejich funkci a přežívání. Po podání denosumabu dochází k poklesu kostní resorpce, k nárůstu BMD a ke snížení rizika fraktur obratlových i mimoobratlových. Oproti působení bisfosfonátů má denosumab na kost reverzibilní účinek, neboť je degradován a není ukládán v organizmu²¹.

2.1.5.2 Osteomalacie a rachitis

Osteomalacie je onemocnění charakterizované snížením minerální komponenty následkem porušené mineralizace nově vytvořené kosti. Vyskytuje se zvýšené množství osteoidu (nemineralizované organické matrix) v kostní matrix, která nekalcifikuje, nebo jen zvolna^{9,27}. Mineralizace je defektní jak v kosti trabekulární, tak kortikální³².

Nejčastější příčinou osteomalacie je nedostatek vitamínu D v důsledku jeho nedostatečného obsahu v potravě, poruch trávení a vstřebávání. Rovněž nedostatek slunečního záření, jaterní a ledvinové choroby, spojené s narušenou přeměnou vitamínu D na aktivní metabolity. Při osteomalacii se objevují neurčité bolesti páteře, pánve, dolních končetin, bolesti svalů, velká svalová únava. V pozdějších stadiích vznikají patologické zlomeniny²⁷.

Rachitis neboli křivice je termín označující osteomalacii u dětí, neboť rozvoj křivice je podmíněn růstem kostí¹². Jedná se o generalizované onemocnění skeletu s nedostatečnou mineralizací kostní tkáně a zvýšenou akumulací osteoidu³⁰. Onemocnění je nejčastěji způsobené nedostatkem vitamínu D. Vitamin D (antirachitický vitamin) zvyšuje vstřebávání vápníku a fosforu ze střeva a jeho ukládání do kostí. Příčinou může být nedostatek vitamínu D ve stravě, nedostatek slunečního záření, které je nutné k přeměně prekursoru vitamínu D na aktivní formu, vzácně se vyskytuje tzv. D rezistentní rachitis (vitamínu D je dostatek, ale chybí jeho receptory). Při nedostatku se snižuje ukládání minerálů do kostí. Chrupavka kosti roste normálním tempem, ale není včas nahrazena mineralizovanou kostní tkání, kosti neunesou velké zatížení a deformují se¹².

Léčba onemocnění spočívá v podávání vysokých dávek vitamínu D, vystavování UV paprskům (slunění, horské slunce). Prevence onemocnění spočívá v profylaktickém podávání D vitamínu dětem v prvním roce života, případně i déle, zejména v zimním období¹².

Existuje též hypofosfatenická křivice (vázaná na chromozóm X či autozomálně dominantní), která je způsobená nadměrnými ztrátami fosforu močí v důsledku zvýšené tvorby fosfaturických faktorů (fosfatoninů). V léčbě se uplatňuje suplementace fosforem a kalcitriolem³³.

2.1.5.3 Pagetova kostní choroba

Pagetova choroba (neboli osteitis deformans, osteodystrophia deformans) je kostní onemocnění charakterizované poruchou remodelace kosti, při které dochází k nadměrné kostní resorpci následované kompenzatorně zvýšenou novotvorbou strukturálně neplnohodnotné kosti³⁹.

V patofyziologii Pagetovy choroby hraje významnou roli genetická predispozice. Pagetova choroba vykazuje familiární výskyt (výskyt v rodinách), je přenášena autosomálně dominantně; 15–30 % postižených má pozitivní rodinnou anamnézu této choroby.

Pagetova choroba může postihovat jednu kost (monostotická forma 15 %), nebo postihuje více kostí (polyostotická forma), případně „soustavu“ kostí. Postihuje obě pohlaví, více muže, výjimečně bývá diagnostikována u mladých osob, nejčastěji u osob po 50. roce života. Mnoho případů probíhá zřejmě subklinicky až symptomaticky. Choroba je progredující ve smyslu „vývoje“ ve stávajících ložiscích, jen vzácně však vznikají nová (raritně četná) ložiska u postižených osob. Nejčastěji jsou postiženy pánev, páteř, lebka a tibie. Kostí horních končetin jsou postiženy méně často než kosti dolních končetin, kosti rukou a nohou jsou postiženy zcela výjimečně. Zdá se, že u většiny pacientů je průběh zcela asymptomatický a choroba je zjištěna na základě náhodného zjištění elevace alkalické fosfatázy nebo při popisu rentgenového snímku, kdy jsou přítomny typické známky nemoci⁴¹.

Klinické projevy onemocnění vycházejí logicky z místa postižení, tedy charakteru anatomických struktur, ale také z aktivity onemocnění. Mezi typické známky onemocnění patří bolesti v místě postižení, a to v klidu i při pohybu, a zvýšená teplota nad místem postižení při hypervaskularizaci tkáně. Může dojít k deformitě – prohnutí kosti, která je rozsáhleji postižena, což následně vede ke zkrácení kosti a např. postižení stereotypu chůze a vzniku artrotických změn. Při postižení páteře se vyskytují bolesti v zádech, které mohou být výsledkem lokální aktivity choroby a současné akcelerace degenerativních změn

páteře. Postižené obratle se zvětšují a mohou být příčinou celé řady neurologických komplikací. Mohou se objevovat paraparézy (často reagující na léčbu základního onemocnění)⁴¹.

Fraktura kosti postižené nemocí, ať již traumatická nebo patologická, je závažnou komplikací. Problémem může být, vzhledem k významné vaskularizaci postižené kostní tkáně, závažné krvácení. K patologickým frakturám dochází častěji v případech, kdy došlo k maligní transformaci v dané lokalizaci díky nemoci. Mohou též vznikat malé fraktury v místě postižení, které však bývají symptomatické. Maligní transformace postižené kosti je vzácnou komplikací s incidencí nižší než 1 %. Histopatologicky jde nejčastěji o osteogenní sarkom (osteosarkom), výjimečně o fibrosarkom nebo chondrosarkom. Prognóza u maligních komplikací je špatná⁴¹.

Základní léčba nemoci je v současné době založena na antiresorpční terapii (bisfosfonáty, kalcitonin), doplněné substitucí vápníku a vitamínu D. Další symptomatickou terapií jsou nesteroidní antirevmatika a analgetika, ortopedické a protetické pomůcky⁴¹.

2.1.6 Vliv stravy na kvalitu kostí

Strava je jedním z ovlivnitelných rizikových faktorů. Strava může mít pozitivní nebo negativní dopad na zdraví kostí. Působí na změnu struktury kostí, rychlost kostního metabolismu, na homeostázu vápníku a na další minerální prvky. Z hlediska prevence jsou důležité minerální látky – vápník, hořčík, fosfor, sodík, draslík, dále různé stopové prvky a vitaminy – D, E, K, C, B. Příjem minerálů i vitaminů může být ovlivněn různými typy diet (vegetariánství, atd.)².

2.1.6.1 Minerální látky ovlivňující tvorbu kostí

Minerální látky mají vliv na kostní zdraví. Jedná se zejména o vápník, hořčík, fosfor, mangan, bor a další. Tyto minerální látky ovlivňují kostní zdraví, aktivují osteoblasty, zvyšují hustotu kostního minerálu a podporují aktivitu některých vitaminů a citlivost kostní tkáně k některým hormonům. Jsou nezbytné pro zdravý růst a vývin kostí².

Nedostatek minerálních látek způsobuje oslabení a křehkost kostí, což vede k častějšímu výskytu zlomenin. Největší význam pro kosti má vápník, který je nezbytný pro jejich zdravý vývin a růst. Některé minerály ovlivňují kostní zdraví nepřímo, např. bór

ovlivňuje metabolismus vápníku, hořčíku, fosforu a vitamínu D, které jsou důležité pro prevenci osteoporózy. Minerální látky nepůsobí pouze jako prevence vzniku kostního onemocnění, ale usnadňují hojení a snižují dobu hojení zlomenin².

- *Calcium (vápník)* – je základní součástí stavebního materiálu kostí³⁰. V těle zdravého člověka o hmotnosti 70 kg je asi 1,3 kg vápníku. Nejvíce se ho nachází v kostech a zubech (99 %), poté v buňkách měkkých tkání (1 %) a v extracelulární tekutině (0,1 %). Téměř k zdvojnásobení zásob vápníku v kostech dochází během puberty⁴. Množství vápníku v organismu nezávisí jen na příjmu, ale i na schopnosti vstřebávání vápníku v tenkém střevě. Největší schopnost asorpce je v dětství (přibližně 75 %) a s věkem klesá. U dospělých se pohybuje mezi 30 až 60 %².
- *Magnesium (hořčík)* – tento prvek ovlivňuje zdraví kostí. 60 % hořčíku je uskladněno v kostech (v krystalové mřížce apatitu), zbytek ve svalech a jiných tkání. Hořčík aktivuje osteoblasty, zvyšuje hustotu kostního minerálu, aktivuje vitamin D a podporuje citlivost tkáně k parathormonu a aktivnímu vitamínu D. Dále podporuje transport vápníku z kosti do kosti a výrazně ovlivňuje kontraktilitu svaloviny. Slouží jako prevence vzniku kostního onemocnění a snižuje dobu hojení zlomenin^{2,33}.
- *Phosphorus (fosfor)* – Fosfor ve formě fosfátů společně s vápníkem tvoří hlavní součást kostí. Přesuny fosfátů v organismu jsou úzce spjaty s pohybem vápníku. Hladina obou je regulována vitamínem D. K poruchám vývoje kostí dochází v důsledku sníženého příjmu fosforu potravou².

2.1.6.2 Vitaminy ovlivňující tvorbu kostí

Vitaminy působí příznivě na tvorbu kosti a celkové kostní zdraví. Jedná se zejména o vitamin D, K, C a vitaminy skupiny B. Tyto vitaminy podporují kostní tvorbu, podílí se na růstu a obnově kostí. Regulují obnovu kostní tkáně, ovlivňují vývoj kostních buněk a mají vliv na vývoj kolagenu. Vitaminy také podporují činnost některých minerálů a pomáhají s jejich zabudováním do kostí².

Největší význam z hlediska prevence má vitamin D. Vitamin K má skoro stejnou funkci v kostním metabolismu jako vitamin D.

- *Vitamin D* – Chemický hormon, který se vytváří v těle. Je rozpustný v tucích. Na rozdíl od ostatních vitaminů se nedostává do těla jen exogenně. V těle dochází k jeho tvorbě působením ultrafialového záření ze slunečního světla a vzniká ve dvou chemických sloučeninách. První sloučenina vzniká z cholesterolu a jde o tzv. cholekalciferol, vitamin D₃. Druhá sloučenina vzniká z ergosterolu a jde o ergokalciferol, který je označován jako vitamin D₂. Vitamin D je jediným vitaminem, který si lidský organizmus dokáže dobře vytvořit. Z cholesterolu vzniká provitamin D a působením UV záření v kůži se mění na provitamin D₃ (cholekalciferol). Z estrogenu se tvoří stejným způsobem provitamin D₂. V játrech a poté v ledvinách probíhá proces hydroxylace a je vytvořen účinný vitamin D. Ten je 25x účinnější než jeho provitamin D².
- *Vitamin C* – vitamin rozpustný ve vodě. Je potřebný pro vývoj kolagenu, stimulaci osteoblastů a zlepšení absorpce vápníku. Také je prokázán pozitivní vztah na kostní objem. Hypovitaminóza se projevuje narušením stavby kostí. Dochází ke krvácením do kloubů a jejich deformacím. Avitaminóza způsobuje otok kloubů, křehkost kostí a svalovou atrofii².
- *Vitamin K* – má dvě přirozeně se vyskytující formy. Vitamin K₁ (fylochinon) je produkován rostlinami a vitamin K₂ (menachinon) je produkován bakteriemi. Můžeme se také setkat se syntetickým vitaminem K₃ (menadion), který se přidává do zvířecích krmiv. V organizmu se z něho vytváří vitamin K₂. Vitamin K₁ působí především v játrech a slouží ke srážení krve. Vitamin K₂ má důležitou roli v metabolismu a mineralizaci kostí. Vitamin K zprostředkovává karboxylaci kostního proteinu osteokalcinu. Vysoké sérové koncentrace osteokalcinu a nízké sérové koncentrace vitaminu K jsou spojeny s nižší kostní denzitou a zvýšeným rizikem fraktury krčku stehenní kosti. Z toho vyplývá, že zvýšený příjem vitaminu K je spojen s nižším rizikem zlomeniny krčku kosti stehenní².
- *Vitamin B₆* – bylo zjištěno, že nedostatek vitaminu B₆ způsobuje osteoporózu u krys. Účinek suplementace tímto vitaminem se vysvětluje jeho účastí při enzymatickém zesílení kolagenních vláken, procesu, který zvyšuje pevnost pojivových tkání. Vitamin B₆ také snižuje hladinu

homocysteinu v krvi, o kterém se předpokládá, že brzdí syntézu kolagenu^{63, 64,65}.

- *Vitamin B₁₂* – ovlivňuje obsah kostního minerálu a kostní denzitu. Studie prokázaly, že vitamin B₁₂ má významný vliv na proliferaci osteoblastů. Minimální koncentrace vitaminu B₁₂ je nutná pro pozitivní proliferaci osteoblastů. Vitamin B₁₂ je zapojen do metabolismu homocysteinu. Homocystein brání mineralizaci kostí a byl spojen s osteoporotickými zlomeninami u mužů a žen nad 55 let. Homocystein je metabolit esenciální aminokyseliny methioninu. Vitaminy skupiny B mají zásadní roli při snižování oxidačního procesu a metylaci různých proteinů^{2,11,65}.

2.1.7 Homocystein a jeho vliv na kostní zdraví

Jak se zmiňuje v kapitole 2.1.5.1 a 2.1.6, kvalitu kostní tkáně ovlivňuje řada faktorů. Jedním z velmi pravděpodobných rizikových faktorů pro kostní zdraví je vysoká hladina homocysteinu. Homocystein je aminokyselina, která vzniká z methioninu odstraněním terminální C-methylové skupiny. Homocystein může být recyklován zpět na methionin nebo přeměněn na cystein. Metabolismus homocysteinu závisí na hladinách vitaminů B₆, B₉, B₁₂ a rovněž také na koncentraci kyseliny listové v séru^{42,43,70}. Vysoké hladiny homocysteinu v krevním séru souvisejí s poruchami cévní morfologie, ztrátou antitrombotické funkce endotelu a se vznikem prokoagulačního prostředí. Hyperhomocysteinémie má vztah ke kardiovaskulárním a neurodegenerativním chorobám, diabetu, trombotickým stavům a Raynaudově fenomenu^{43,44,45}.

U dospělých osob byla již opakovaně prokázána souvislost mezi vysokými hodnotami S-Hcy a nízkou BMD^{47,52}. Byly rovněž dokumentovány vysoké hodnoty S-Hcy u osteoporotických postmenopauzálních žen bez vztahu k hodnotám BMD⁴⁸. Byla též prokázána souvislost mezi vysokými hladinami S-Hcy zvýšeným rizikem zlomeniny kyčle u seniorské populace⁵¹.

Vzhledem k tomu, že u dětí již byla prokázána jasná souvislost mezi nízkou BMD a výskytem fraktur^{59,60}, hyperhomocysteinémie může znamenat významný rizikový faktor pro kostní zdraví u dětské populace.

Z hlediska patofyziologického je vztah osteoporózy u pacientů s vysokou hladinou homocysteinu v séru vysvětlován akumulací homocysteinu v kosti, což vede k úbytku

trámčité kostní tkáně a zhoršení mechanické odolnosti skeletu⁵⁰. Homocystein též stimuluje osteoklastickou aktivitu⁶¹. Svůj podíl může též mít snížená metylační kapacita kostí⁶². Z těchto poznatků vyplývá, že vysoké hladiny homocysteinu v séru způsobují sníženou kostní denzitu. Snížená hodnota kostní denzity proti normálu má signifikantní vliv na biomechanické parametry kosti neboli pevnost, odolnost a pružnost. Riziko poškození kosti (obvykle fraktura) je významně vyšší při snížené kostní denzitě.

2.1.8 Biomechanické vlastnosti kostí

Kost není v pravém slova smyslu tkáň, ale orgán (či komplexní biomateriál), který z mechanického hlediska vykazuje různé mechanické vlastnosti podle své struktury, lokality, směru zatížení, zátěžové historie atd. U kostí platí zákon minima-maxima, který říká, že struktura kosti je vybudována s minimálním množstvím materiálu při maximální pevnosti v daném směru²⁶.

Biomechanické vlastnosti kostní tkáně jsou v první řadě dány kolagenovou maticí a minerály. Kolagenní vlákna odolávají tahu, ale pro jiné způsoby zatížení jsou poddajná. Minerální látky, především kalcium ve formě hydroxyapatitu, dodávají kosti tvrdost a křehkost. Proto je demineralizovaná kost měkká a poddajná. Deproteinizovaná kost je naopak tvrdá, křehká a snese jen nízké zatížení v tahu²⁶.

Základními typy kostí jsou spongiozní kost a kompaktní kost, které se od sebe výrazně odlišují jak strukturou, tak mechanickými vlastnostmi. Reálné kostní útvary vykazují vždy kombinaci obou typů kostní tkáně²⁶. Kompaktní kostí tkáň je nehomogenní, anizotropní a nelineárně viskoelastický biomateriál¹⁹. Bylo zjištěno, že kompakta dlouhých kostí snáší obrovské statické zatížení silou působící ve směru její osy: humerus snese zatížení tíhou odpovídající hmotnosti asi 600 kg; femur asi 760 kg, ale tibie až 1350 kg⁴⁰. Spongiozní kost je známa funkčně podmíněnou stavbou, kdy jsou trámečky vystavěny tak, že jejich směr souhlasí se směrem hlavních napětí²⁶.

Mechanické vlastnosti kostí:

Vzhledem k principu remodelace kostní tkáně závislém na mechanickém působení je kostní tkáň nehomogenní (nemá stejné rozložení hmoty v objemu) a anizotropní (různá odezva na zatížení z různých směrů). Závislost mechanických vlastností na směru, kterým působí vnější zatížení, je značná. Při zatížení v podélném směru kosti, může být mez pevnosti až 10x vyšší než ve směru radiálním a tangenciálním. Navíc ještě záleží na

způsobu zatížení. Obecně lze říci, že v tlaku je pevnost kosti nejvyšší, o třetinu nižší v tahu a jen třetinová ve smyku. Dále, vzhledem k viskoelastickým vlastnostem kostní tkáně, závisí mechanické vlastnosti kosti na rychlosti deformace. S rychlostí deformace stoupá mez pevnosti, elastický modul a naopak klesá maximální dovolená deformace a absorbuje se větší množství energie²⁶.

Změny mechanických vlastností kostní tkáně:

Vzhledem k neustálé remodelaci kostní tkáně na základě mechanické zpětné vazby jsou její mechanické vlastnosti dány historií zatěžování. To znamená, že pokud je orgán imobilizován, snižuje se výrazně jeho pevnost a poddajnost, a naopak opakovaným zatěžováním s dostatečnou intenzitou je možné předcházet poruchám remodelace (např. osteoporóza) a s tím spojeným zvýšeným rizikem zlomenin v důsledku snížení mechanické pevnosti. S věkem se mechanické vlastnosti mění ve smyslu zvyšování pevnosti a snižování maximální deformace. Celkově je kost starší osoby schopna absorbovat menší množství deformační energie v porovnání s mladým jedincem²⁶.

2.2 Mechanické chování viskoelastických těles

Mechanickým chováním těles (v užším slova smyslu) rozumíme relace mezi deformujícími silami a odpovídajícími deformacemi. U homogenních těles je mechanické chování také možné popsat relacemi mezi mechanickým napětím a relativní deformací. Jinými slovy materiálovými parametry. Viskoelastická je reologickou vlastností materiálu a u těles je určena vlastnostmi elastickými a viskózními.

2.2.1 Reologické modely mechanického chování

2.2.1.1 Klasická reologie

Havránek¹⁰ uvádí, že reologie se konstituovala jako samostatný obor ve dvacátých letech minulého století, kdy Markus Reiner začal uveřejňovat své práce později shrnuté pod názvem Reologie v základním kompendiu fyziky *Handbuch der Physik* (M. Reiner, *Rheology*, v: *Handbuch der Physik, Bd. VI Elastizität und Plastizität*, ed. S. Flügge, Springer-Verlag, Berlin 1958) a v roce 1929 byla z iniciativy E. C. Binghamy založena americká reologická společnost *The Society of Rheology*, která okamžitě začala vydávat časopis *Journal of Rheology*. Při svém založení definovala společnost reologii jako nauku o deformaci a tečení látek. Tím byla konstituována disciplína, která shrnuje snažení početných vědců, mezi nimiž bylo i mnoho zvučných jmen známých z jiných oborů fyziky (např. Kelvin, Maxwell, Voigt, Poynting), kteří si uvědomovali, že přímá úměrnost mezi napětím a deformací, která je obsahem známého Hookova zákona, nemůže pro řadu látek být ani přibližným vystižením jejich mechanického – v nově zaváděném pojetí reologického – chování. Ukázalo se, že klasická teorie pružnosti a její odnož technická pružnost, které slavily velké úspěchy při popisu mechanického chování tehdy nejběžněji



užívaných kovových materiálů, principiálně selhávají při popisu takových látek, jako jsou pryže, asfalty, těsta, kůže apod.³⁸ Z druhé strany se ukázalo, že tečení látek, jako jsou např. med, malta, mazací oleje, laky, tělní tekutiny, je podstatně složitější než tečení vody a lihu, které byly typickými kapalinami, pro které platí klasická hydrodynamika. Při konstituování reologie se ukázalo, že není vhodné striktně rozlišovat pevné látky a kapaliny, ale je vhodnější

Obr. 5: Znak americké reologické společnosti

brát v úvahu ve složitějších kapalinách určité elastické vlastnosti a v pevných látkách vlastnosti kapalin, tedy jejich tečení. Z poslední úvahy vyjádřené řeckým sloganem *παντα ρει* (panta rei – všechno teče) je odvozen i název nové disciplíny – **reologie**. Heslo *παντα ρει* se objevuje i ve znaku americké reologické společnosti, který je na Obr. 5. Nadpis tohoto znění rámuje přesýpací hodiny, které symbolizují univerzálnost toku. Písek, který odpočítává čas, teče úzkým otvorem¹⁰.

Definice reologie, resp. definice toho, v co se reologie za přibližně osmdesát let své existence vyvinula, je tato: „Reologie je materiálová věda, která zkoumá vztah mezi napětím a deformací v látkách nejrůznějšího charakteru, přičemž nevytváří ostrou hranici mezi látkami převážně pevnými a převážně kapalnými. Pro charakterizaci látek vytváří modely složené z elastických, viskózních a plastických členů¹⁰.“

2.2.1.2 Lineárně elastická tělesa

Tuhost charakterizuje schopnost materiálu odolávat působení vnějších sil. Praktickou představou tuhosti může být obyčejná vinutá pružina, která se po zatížení deformuje. Viskozitu lze definovat jako poměr mezi tlakem v kapalině a rychlostí jejího tečení nebo lze definovat také jako poměr působící síly a rychlosti deformace tlumiče²³.

Již v roce 1660 formuloval Robert Hooke vztah mezi silou F a deformací ΔL u pružin⁸. Jedná se o následující lineární závislost (Obr. 6):

$$F = H \Delta L,$$

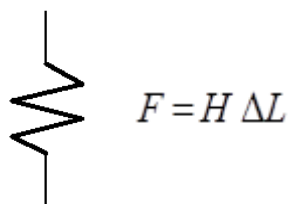
kde H je konstanta pružiny neboli tuhost.

Tento tzv. Hookeův zákon se doposud často používá pro popis mechanického chování tzv. lineárně elastických těles.

Často se Hookeův zákon také formuluje pomocí materiálových parametrů takto:

$$\sigma = E \varepsilon,$$

kde σ je namáhání (mechanické napětí), E je modul pružnosti, ε je relativní deformace. V případě namáhání v tahu a tlaku se modul pružnosti označuje jako Youngův modul. Je nutno zdůraznit, že výše uvedené vztahy nejsou zcela ekvivalentní⁶.



Obr. 6: Ilustrace k Hookeově zákonu

Hookeův zákon v sobě obsahuje samozřejmý předpoklad, že parametr H je konstantní. Předpokládá se tedy, že nezávisí ani na velikosti deformace, ani na dynamice změn deformace či frekvenci zatěžování. Tento předpoklad je u reálných těles splněn spíše výjimečně. Podle Hookeova zákona se v přijatelné míře chovají například kovy, a to až do meze úměrnosti v pracovním diagramu (lineární oblast v Obr. 7).

Důležitou vlastností elastických těles je jejich „elastické“ chování. Elastickým chováním se rozumí skutečnost, že při opakovaném zatěžování nevzniká žádná trvalá deformace⁵.



Obr. 7: Příklad pracovního diagramu nebiologických materiálů, např. oceli

2.2.1.3 Nelineárně elastická tělesa

S významně nelineárním chováním se lze často setkat zejména u biologických struktur, tzn., že biologické struktury mají obvykle nelineární závislost mezi silami a

deformacemi. Problematika nelineárních systémů je mnohem komplikovanější, než problematika systémů lineárních. Z praktického hlediska je důležité, že i nelineární systémy je často možné považovat za přibližně lineární pro malé změny namáhání a deformací. Nelineární systémy lze tedy často považovat za lineární „po úsecích“ a pro řešení problematiky nelineárních systémů využít teorii systémů lineárních⁶.

Biologické struktury mají obvykle nelineární závislost mezi silami a deformacemi. Hookeův zákon u nich v původně formulovaném znění nelze aplikovat. Obvykle je však možné předpokládat, že chování je „po částech“ lineární a tedy linearizovatelné pro malé změny sil a deformací. Hookeův zákon pak platí v této podobě⁶:

$$\Delta F = H_D \Delta L .$$

V diferenciální formě:

$$dF = H_D dL .$$

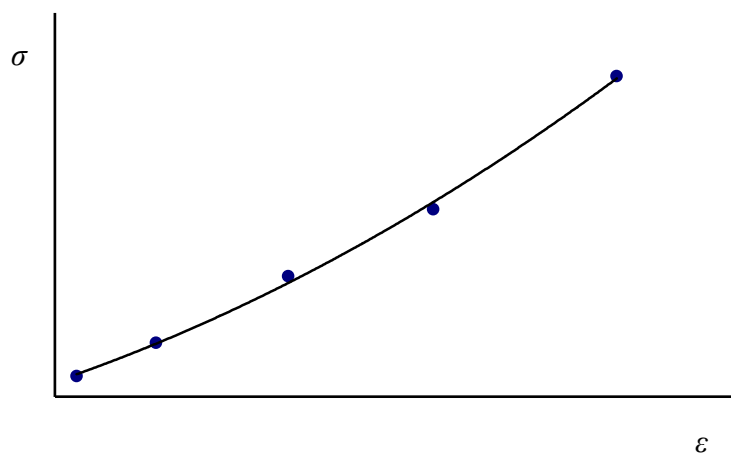
Diferenciální tuhost H_D je směrnice k pracovnímu diagramu pro jistou hodnotu ustálené síly.

Podobně je možné vycházet z materiálových parametrů:

$$\Delta \sigma = E_D \Delta \varepsilon ,$$

respektive:

$$d\sigma = E_D d\varepsilon .$$



Obr. 8: Příklad pracovního diagramu biologických materiálů – stěna aorty

Výše uvedený popis jak lineárně elastických, tak po částech lineárních elastických mechanických systémů v sobě implicitně obsahuje předpoklad, že parametry systému (H i H_D) jsou nezávislé na dynamice změn sil a deformací. Protože tomu tak v realitě není, jedná se o pouze modely, jejichž chování se od chování reálných těles při dynamickém zatěžování více či méně liší. Vyplývá z toho závěr, že **elastický popis charakterizuje dostatečně úplně pouze statické chování těles**^{5,6}.

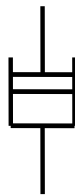
2.2.1.4 Reologické modely lineárně viskoelastických těles

Teprve v devatenáctém století se začaly objevovat práce popisující dynamické chování těles³⁵. Jinými slovy, začala se studovat viskoelasticita těles a materiálů. Viskoelasticita je vlastnost materiálů (a těles), které mají nejen elastické vlastnosti, ale i vlastnosti viskózní. Vznikla řada tzv. reologických modelů, spočívajících v kombinaci základních reologických těles⁶.

Základní reologická tělesa – Hookeovo a Newtonovo těleso



Obr. 9: Hookeovo těleso – reologickým symbolem je stylizovaná pružina



Obr. 10: Newtonovo těleso – reologickým symbolem je stylizovaný píst

Hookeovo čili elastické těleso se chová v souladu s Hookeovým zákonem (vztah $H.L=F$). Závislost mezi silami a deformacemi je lineární. Síla F způsobí v Hookeově tělese deformaci L . Newtonovo čili viskózní těleso se chová podobně jako newtonovská kapalina⁶.

Vztah mezi silou a deformací je následující:

$$F = N \frac{dL}{dt},$$

kde N je Newtonův koeficient a je konstantní.

Mechanické chování Newtonova tělesa při namáhání v tahu se často vyjadřuje formou materiálových konstant takto:

$$\sigma = \eta_N \frac{d\varepsilon}{dt}$$

kde σ je normálové napětí, η_N je „normálová“ viskozita, ε je relativní prodloužení⁶.

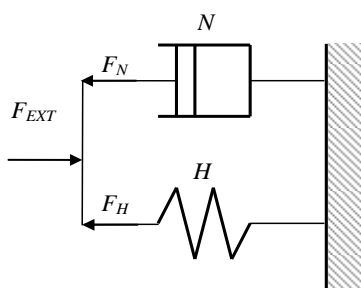
Reologické modely

Klasické reologické modely jsou tvořeny kombinacemi Hookeových a Newtonových členů. Zejména při rychlých změnách zatěžování se chování kteréhokoli reologického modelu významně liší od reality, protože chování reálných těles je ovlivněno i setrvačnými silami. K odstranění tohoto nedostatku je třeba klasické modely doplnit ještě setrvačnými členy. V následujícím textu jsou uvedeny základní typy modelů mechanického chování viskoelastických těles⁶.

Je nutno zdůraznit, že tyto modely jsou lineární v tom smyslu, že odpovídající diferenciální rovnice, popisující vztahy mezi silami a deformacemi, je lineární. Reálná tělesa se při opakovaném zatěžování chovají zpravidla jako lineární či po částech lineární systémy. Podstatně nelineárním chováním (například Binghamovým modelem) se proto nebudeme zabývat⁶.

Kombinací Hookeových a Newtonových těles lze získat různě složité modely. Mezi jednoduché modely patří model Voigtův či Maxwellův.

Voigtův model



Obr. 11: Voigtův model (Kelvinovo těleso)

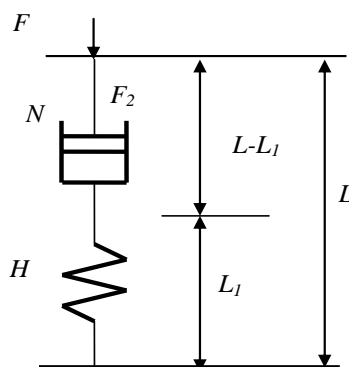
Voigtův model je tvořen „paralelní“ kombinací Hookeova a Newtonova tělesa. Nebere v úvahu vliv setrvačných sil. Obě základní tělesa se deformují stejným způsobem (deformace je společná). Celková deformující síla je rovna součtu sil u obou těles⁶:

$$F_{ext} = H L + N \frac{dL}{dt},$$

s použitím materiálových parametrů přibližně:

$$\sigma = E \varepsilon + \eta \frac{d\varepsilon}{dt}.$$

Maxwellův model



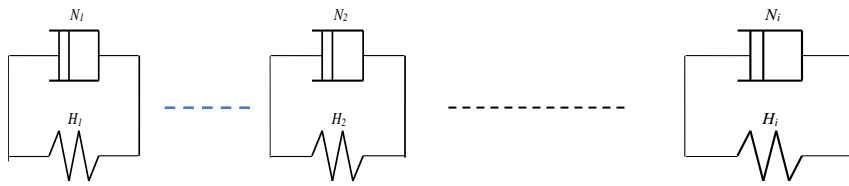
Obr. 12: Maxwellův model

Maxwellův model je tvořen „sériovou“ kombinací Hookeova a Newtonova tělesa. Na obě tělesa působí shodné síly. Celková deformace je rovna součtu deformací obou těles⁶

$$L = \frac{F}{H} + \frac{1}{N} \int F . dt .$$

Generalizovaný Voigtův model

Tento model je tvořen „sériovou“ kombinací jednotlivých Voightových modelů. Výsledná celková deformace je rovna součtu jednotlivých deformací^{5,25}.



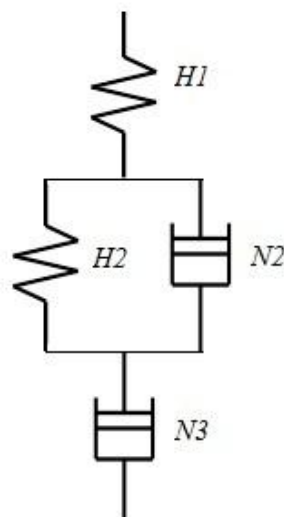
Obr. 13: Generalizovaný Voigtův model

Kombinované reologické modely

Kombinované reologické modely jsou tvořeny různými kombinacemi jednoduchých reologických modelů, např. Voigtova a Maxwellova modelu s přidáním setrvačného členu. Některé kombinované reologické modely pro názornost jsou uvedeny níže.

Čtyřprvkový model

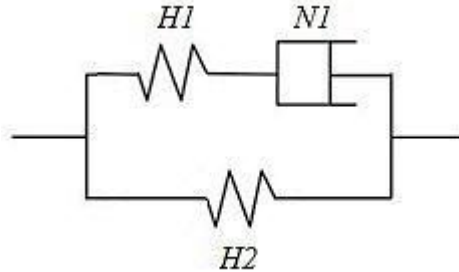
Čtyřprvkový model (neboli Four-element model) je tvořen „sériovou“ kombinací Maxwellova a Voigtova modelu¹³. Tento model se často využívá k jednoduchému popisu viskoelastických deformací polymerů²⁴.



Obr. 14: Čtyřprvkový model¹⁶

Zenerův model

Dalším reologickým modelem je Zenerův model. Jedná se o model tvořený „sériovou a paralelní“ kombinací tří prvků¹³.

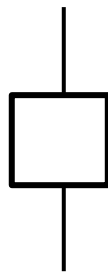


Obr. 15: Zenerův model¹⁵

Reologické modely doplněné o vliv setrvačných sil

Klasické reologické modely neberou v úvahu vliv setrvačných sil. Implicitně se předpokládá, že setrvačné síly lze považovat za zanedbatelné proti silám elastickým a viskózním. Setrvačné síly však rostou se čtvercem frekvence deformace. Při rychlých změnách zatěžování (při vysokých frekvencích) přestávají být zanedbatelné. Platí to zejména u kostí, a zcela obecně, u struktur spojených s dalším tělesem o velké hmotnosti⁶.

Klasické reologické modely je proto nutné doplnit o setrvačný člen.

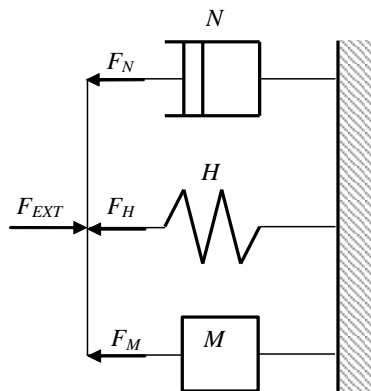


Obr. 16: Symbol setrvačného členu

Vztah mezi silou a deformací u setrvačného členu je následující:

$$F = M \frac{d^2 L}{dt^2} .$$

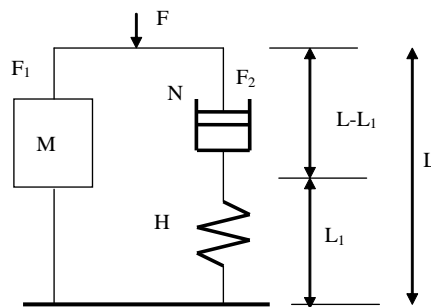
Voigtův model se setrvačným členem



Obr. 17: Voigtův model se setrvačným členem

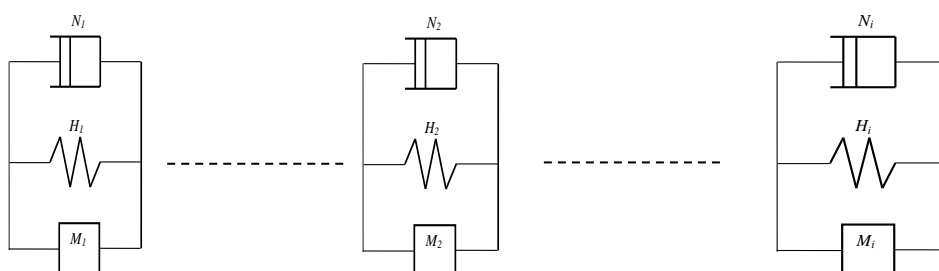
Voigtův model se setrvačným členem je tvořen „paralelní“ kombinací Hookeova, Newtonova a setrvačného tělesa. Všechna základní tělesa se deformují stejným způsobem (deformace je společná). Celková deformující síla je rovna součtu sil u všech těles. Setrvačné těleso se pohybuje společně s těžištěm soustavy⁶.

Maxwellův model se setrvačným členem



Obr. 18: Maxwellův model se setrvačným členem

Univerzální model mechanického chování lineárně viskoelastických těles



Obr. 19: Univerzální model mechanického chování lineárně viskoelastických těles

Univerzální model mechanického chování lineárně viskoelastických těles (sériová kombinace Voigtových členů doplněných paralelní setrvačností) odpovídá svým chováním základní diferenciální rovnici pro lineárně viskoelastická tělesa⁵:

$$a_0 y + \sum_{l=1}^n a_l y^{(l)} = b_0 x + \sum_{m=1}^m b_m x^{(m)} .$$

Parametry H , N a M jsou v případě lineárních systémů konstanty.

Pokud se viskoelastické těleso chová lineárně jen po částech, lze z předchozí rovnice dospět ke stejné struktuře, ale parametry H , N a M jsou závislé na frekvenci a na předpětí⁵.

Principiální nedostatky reologických modelů

Hlavním nedostatkem je předpoklad lineárního chování jednotlivých základních těles. Dalším problémem je, že reologické modely předpokládají, že parametry je možno soustředit do několika málo základních těles. V realitě jsou parametry rozloženy v celém objemu tělesa. Tento problém se projevuje u těles s délkou větší či srovnatelnou s vlnovou délkou mechanické vlny. U biologických struktur tento problém odpadá, vzhledem k tomu, že jejich délka je v reálných situacích mnohem menší než vlnová délka mechanické vlny⁵.

Z praktického hlediska je závažné, že u zkoumaných struktur nelze předem mít informace o struktuře adekvátního modelu ani o míře linearitě modelů. Identifikace struktury reologického modelu je vždy problematická⁵.

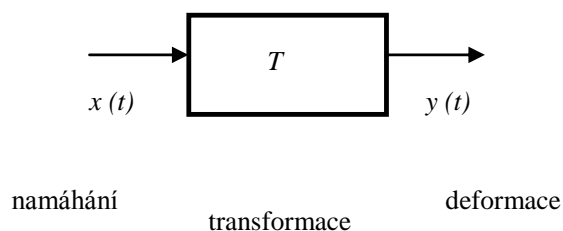
V současné době se proto hledají vhodnější metody popisu viskoelastivity, tedy popisu dynamického chování těles a materiálů. Tyto metody vycházejí z konstitutivních

diferenciálních rovnic a využívají metodu jejich řešení pomocí Laplaceovy nebo Fourierovy transformace⁵.

2.2.2 Dynamické chování viskoelastických těles

Dynamické namáhání reálných těles je vždy provázeno určitými ztrátami energie. Názorně se tato skutečnost projevuje tím, že vlastní kmity i zdánlivě elastických těles jsou vždy do jisté míry tlumené. V popisu závislosti mezi silami a deformacemi se ztráty energie projevují existencí viskózní složky chování. Dá se tedy konstatovat, že všechna reálná tělesa jsou do jisté míry tělesa viskoelastická. V praxi se za viskoelastická tělesa považují tělesa v situaci, kdy viskózní složka mechanického chování není zanedbatelná proti složce elastické a setrvačné⁶.

2.2.2.1 Základní diferenciální rovnice pro lineární viskoelastické systémy



Obr. 20: Ilustrace k základní rovnici pro popis lineárních mechanických systémů

U lineárních systémů je transformace T mezi namáháním a deformací dána lineární diferenciální rovnicí s konstantními koeficienty. Rovnice, která popisuje vztahy mezi vstupem a výstupem, má následující tvar:

$$a_0 y + \sum_{l=1}^n a_l y^{(l)} = b_0 x + \sum_{m=1}^m b_m x^{(m)},$$

kde a a b jsou koeficienty, l a m jsou stupně derivace, x je vstupní veličina (síla či mechanické napětí), y je výstupní veličina (absolutní či relativní deformace)⁶.

Výše uvedená rovnice představuje úplnou informaci o dynamickém chování lineárních systémů a umožňuje i řešení inverzního problému. Neposkytuje však jednoduchý a názorný prostředek k hodnocení dynamického chování ani k řešení inverzního problému⁶.

Princip superposice

U lineárních systémů vyplývá z rovnice tzv. princip superposice, který významně zjednodušuje řadu odvození a výpočtů. Podle tohoto principu je celková odezva výstupní veličiny na více vstupních veličin dána součtem odezev na jednotlivé vstupní veličiny samostatně⁶.

Platí:

$$y(x_1 + x_2 + \dots) = y(x_1) + y(x_2) + \dots,$$

kde y je výstupní veličina (odezva), x je vstupní veličina (stimul).

V mechanice lineárních systémů tedy platí, že výsledná deformační odezva na více namáhání (sil, tlaků) je součet deformačních odezev na jednotlivá namáhání⁶.

Odvozené veličiny

Operátorová dynamická tuhost $\Gamma(p)$ je poměr Laplaceových obrazů síly $F(p)$ a deformace $L(p)$

$$\Gamma(p) = \frac{F(p)}{L(p)}.$$

Operátorová dynamická tuhost i prvků spojených se společnou silou (tzv. sériové spojení) se vypočte:⁶

$$\frac{1}{\Gamma_{CS}} = \sum_i \frac{1}{\Gamma_i}.$$

Operátorová dynamická tuhost i prvků spojených se společnou deformací (tzv. paralelní spojení) se vypočte⁶:

$$\Gamma_{CP} = \sum_i \Gamma_i.$$

Dynamická tuhost $G(i\omega)$, někdy označovaná také jako komplexní dynamická tuhost, je poměr Fourierových obrazů síly $F(i\omega)$ a deformace $L(i\omega)$ ⁶:

$$G(i\omega) = \frac{F(i\omega)}{L(i\omega)}.$$

Absolutní hodnota dynamické tuhosti je

$$|G(\omega)| = \sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2},$$

kde Re je reálná část dynamické tuhosti a Im je imaginární část dynamické tuhosti.

Dynamická tuhost n prvků spojených společnou silou (tzv. sériové spojení) se vypočte ⁶:

$$\frac{1}{G_{CS}(i\omega)} = \sum_1^n \frac{1}{G_j(i\omega)}.$$

Dynamická tuhost j prvků spojených společnou deformací (tzv. paralelní spojení) se vypočte ⁶:

$$G_{CP}(i\omega) = \sum_j^n G_i(i\omega).$$

Výše uvedené veličiny popisují chování těles jako celku. Pro materiály se používají následující veličiny.

Operátorový modul pružnosti $E(p)$ je poměr Laplaceových obrazů $\sigma(p)$ napětí a relativní deformace $\varepsilon(p)$

$$E(p) = \frac{\sigma(p)}{\varepsilon(p)}.$$

Komplexní modul pružnosti $E(i\omega)$ je poměr fázorů $\sigma(i\omega)$ napětí a relativní deformace $\varepsilon(i\omega)$

$$E(i\omega) = \frac{\sigma(i\omega)}{\varepsilon(i\omega)}.$$

Imaginární složka komplexního modulu pružnosti se nazývá *loss modulus* E_L (ztrátový modul) a vyjadřuje relativní část energie, která se při zatěžování harmonickým

mechanickým namáháním o frekvenci ω přemění v teplo. Pro disipativní energii plyne vztah⁶:

$$E_L = \left| \frac{\sigma}{\varepsilon} \right| \sin \varphi ,$$

kde úhel φ je fázový posun mezi harmonickými průběhy napětí a relativní deformace.

Platí také:

$$E_L = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \varphi ,$$

kde σ_0 a ε_0 jsou amplitudy harmonických průběhů napětí a deformace⁶.

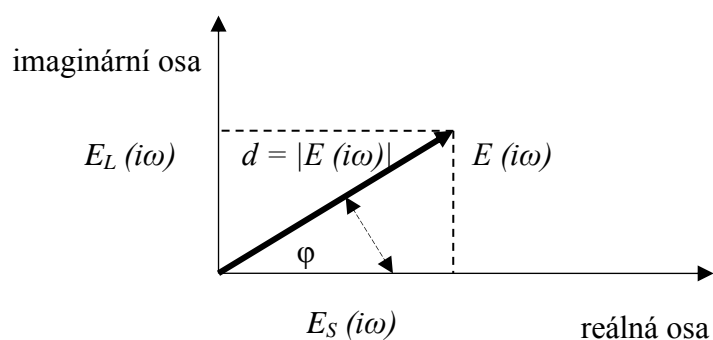
Reálná část komplexního modulu pružnosti se nazývá *storage modulus* E_S (konzervativní modul), který vyjadřuje konzervativní energii, která se transformuje mezi elastickou a setrvačnou složku energie bez ztrát.

Platí, analogicky jako u ztrátového modulu⁶:

$$E_S = \left| \frac{\sigma}{\varepsilon} \right| \cos \varphi ,$$

a také

$$E_S = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \varphi .$$



Obr. 21: Komplexní modul pružnosti

2.2.2.2 Disipace energie u viskoelastických těles

Těleso je mechanická soustava, obsahující jistou vnitřní energii U . Tato vnitřní energie je principiálně tvořena veškerou energií obsaženou v tělese. Pokud je do soustavy vnesena energie E , pak podle zákona o zachování energie platí⁶:

$$\partial E = dU - \partial W,$$

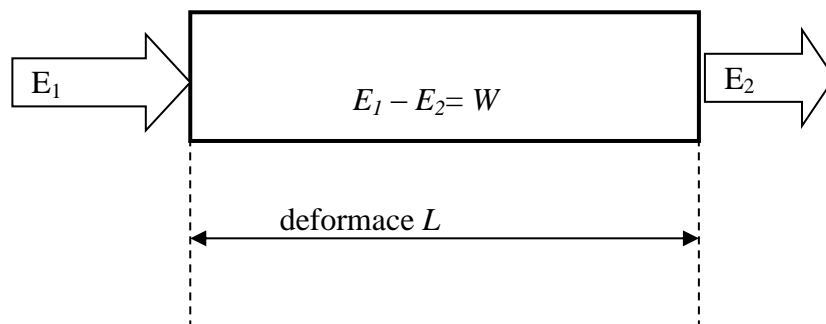
kde ∂W je mechanická práce vykonaná soustavou.

Pro mechanickou práci platí:

$$\partial W = p dV,$$

kde V je objem soustavy.

Mechanická práce W má disipativní charakter a odpovídá energetickým ztrátám během deformačního děje. U viskoelastických těles je za disipaci energie zodpovědná viskózní složka chování tělesa. Konzervativní složka obsahuje energii pohybovou a energii elastickou. Další formy vnitřní energie považujeme během deformačního děje za neměnné. U izolovaného tělesa bez disipativních ztrát (u elastického tělesa) zůstává během deformačního děje konzervativní energie v tělese uchována. Konzervativní energie může být u tělesa spojeného s dalšími strukturami předávána dále do navazujících struktur⁶.



Obr. 22: Ilustrace k vysvětlení vztahů mezi konzervativní a disipativní energií

Pokud je do tělesa vložena energie E_1 , rozdělí se na změnu vnitřní energie tělesa W a na energii předanou navazujícím strukturám a na práci vykonanou tělesem E_2 (Obr. 22). V dalších úvahách budeme předpokládat, že síly a deformace mají v tělese stejný směr (jednoosé namáhání)⁶.

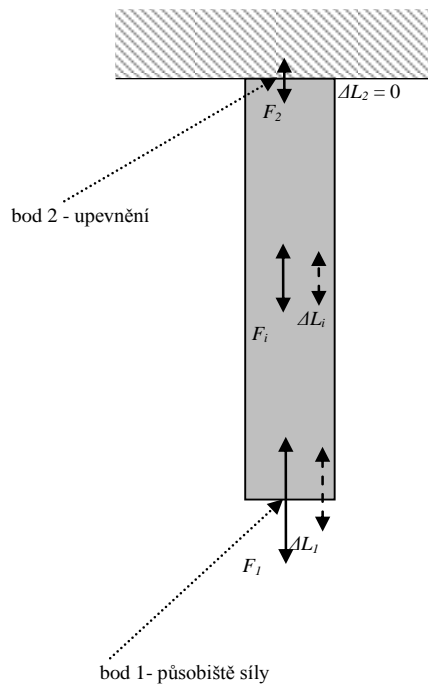
Disipativní energie odpovídá práci vykonané tělesem při pohybu. Je dána skalárním součinem vektoru síly (F) a dráhy (l). Při posunutí tělesa podél elementární dráhy dl , dostáváme pro elementární práci vztah⁶

$$dW = F \cdot dl .$$

2.2.2.3 Tlumení sil a deformací v soustavách viskoelastických těles

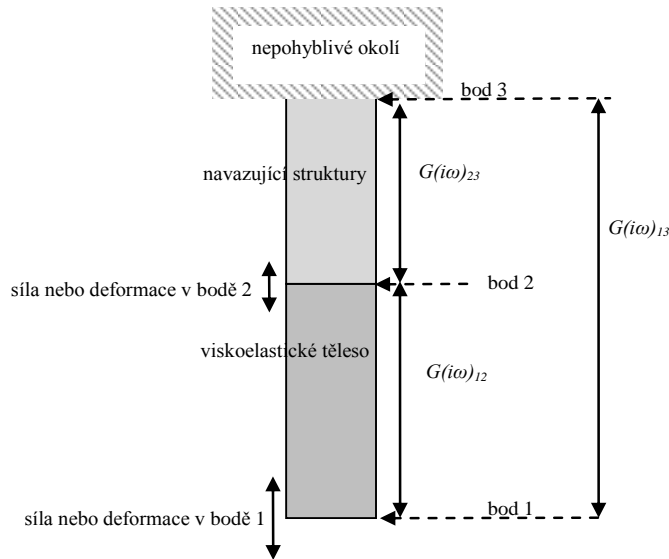
V biomechanice se často setkáváme se situací, kdy dvě nebo více viskoelastických struktur jsou ve vzájemném kontaktu. Pokud jsou tyto struktury namáhány dynamicky, změny sil i deformací se šíří podél těchto struktur konečnou rychlostí s nezanedbatelným útlumem. Na kontaktu struktur s rozdílnými mechanickými vlastnostmi dochází ke vzniku dodatečných namáhání. Tyto jevy ovlivňují riziko porušení těchto struktur⁶.

Disipace energie vede k tlumení tlaků i deformací. Pokud máme tyč z homogenního materiálu, pevně ukotvenou v bodě 2 (Obr. 23), na kterou působí v bodě 1 síla F_1 , pak se v místě ukotvení objeví síla F_2 s jistým zpožděním a jistým útlumem. Síly a deformace v místech uvnitř tyče jsou mezi hodnotami pro tyto krajní body. V případě, že tyč je relativně krátká, pak je síla $F_1 \approx F_2$, protože časové zpoždění a útlum jsou zanedbatelné. Pokud je tyč v bodě 2 pevně ukotvena, je deformace v bodě 2 nulová⁶.



Obr. 23: Síly a deformace podél pevně ukotvené tyče

Útlum sil a deformací lze provést na základě znalostí dynamických tuhostí.



Obr. 24: Útlum ve viskoelastických strukturách

V celé struktuře (viskoelastické těleso plus navazující struktury) podle Obr. 24 dochází k disipaci energie. V naší situaci je energie N_{13} , ztracená v celé struktuře za jednotku času, dána vztahem popisujícím situaci v bodě 1⁶:

$$N_{13} = \omega \frac{F_1 l_1}{2} \sin \varphi_{13}$$

kde F_1 je amplituda deformující síly v bodě 1, a l_1 je amplituda deformace v bodě 1, φ_{13} je fázový posun mezi průběhem síly a deformace. Vzhledem k tomu, že pro dynamickou

tuhost platí $G_{13}(i\omega) = \frac{F_1(i\omega)}{l_1(i\omega)}$ lze předchozí vztah lze dále upravit⁶:

$$N_{13} = \omega \frac{F_1^2}{2|G_{13}|} \sin \varphi_{13}$$

Pro energii ztracenou mezi body 2 a 3 (energie ztracená v navazujících strukturách) platí analogicky⁶:

$$N_{23} = \omega \frac{F_2^2}{2|G_{23}|} \sin \varphi_{23}$$

kde F_2 je amplituda deformační síly v bodě 2.

Pro energii ztracenou mezi body 1 a 2 (energie ztracená v tělese) platí opět analogicky⁶:

$$N_{12} = \omega \frac{(F_1 - F_2)^2}{2|G_{12}|} \sin \varphi_{12}, \text{ a zároveň platí: } N_{13} = N_{12} + N_{23}.$$

2.2.2.4 Řešení inverzního problému

Ve svém celku je problematika řešení inverzního problému velmi rozsáhlá. V dané situaci se jedná o výběr (identifikaci) nejvhodnějšího modelu a výpočet jeho parametrů u lineárních a po částech lineárních systémů. Tato oblast je již teoreticky dobře zvládnutá, přesto její praktická aplikace není triviální. Vyžaduje především pečlivou analýzu platnosti předpokladů, na nichž jsou používány modely založeny, dále je třeba vycházet ze správně provedených a spolehlivých měření. Podmínkou *sine qua non* je dostupnost vhodné měřicí aparatury⁶.

Pokud je možno použít modely se soustředěnými parametry, znamená to podstatné zjednodušení problematiky řešení inverzního problému. Viskoelastická tělesa v této situaci se považují za systémy složené z kombinací tří základních reologických typů těles. Řešení inverzního problému vychází zpravidla z měření vhodně vybraných charakteristik⁶.

Identifikace modelu a výpočet parametrů – frekvenční charakteristiky

Znalost frekvenční charakteristiky je mimořádně důležitá pro určení deformační reakce daného tělesa či materiálu pro libovolný průběh deformující síly, pro výpočty energetických ztrát, mechanické impedance apod. Je-li známa amplitudová frekvenční charakteristika pro dostatečný počet frekvencí, lze tyto a podobné problémy relativně snadno řešit⁶.

Po praktické stránce je však přímé měření frekvenčních charakteristik mechanických systémů pro větší počet frekvencí obtížné, drahé a často i málo přesné. Pokud to situace umožňuje, je proto výhodnější určit nejprve dynamickou tuhost nebo komplexní modul pružnosti z jiných charakteristik, a frekvenční charakteristiku pak dopočítat⁶.

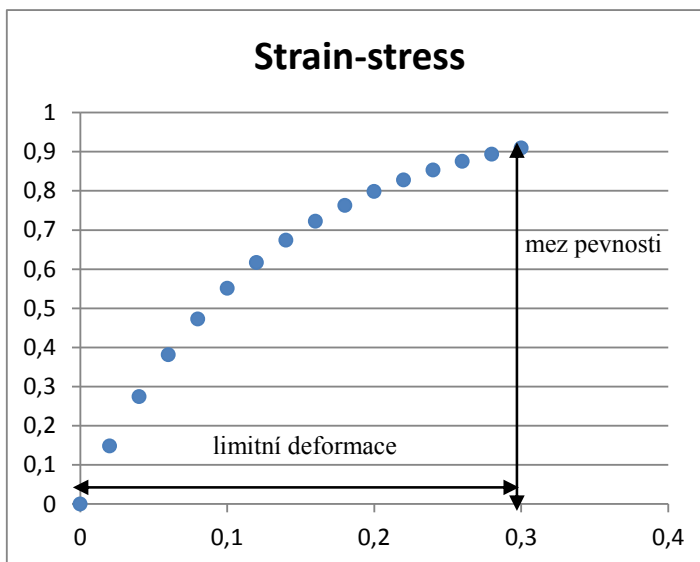
2.2.3 Dynamická pevnost viskoelastických těles

Riziko porušení celistvosti kostí (mimo jiné také fraktur) roste s věkem a souvisí s řadou onemocnění. Zvláště významná je tato problematika u kostí. Dynamická pevnost těles souvisí s jejich mechanickými vlastnostmi, tedy i s viskoelasticitou⁵.

Riziko poruchy (lom, prasknutí, poškození) se obvykle hodnotí podle meze pevnosti. Tyto meze jsou však popsány pouze při jednorázovém zatížení. V reálných podmínkách zatěžování biologických materiálů jsou však struktury (včetně kostí) zatěžovány v mnoha cyklech. K poruše může dojít i při menším namáhání než je mez pevnosti. V podstatě nesmí být zatěžování větší, než je mez elasticity, tedy nesmí při cyklickém zatěžování vznikat žádná trvalá deformace⁵.

Protože kvantitativní popis vztahu mezi viskoelasticitou a dynamickou pevností nebyl dosud v dostupné literatuře uspokojivě popsán, je této problematice věnována podrobněji následující část práce⁵.

Pevnost při statickém namáhání



Obr. 25: Příklad pracovního diagramu viskoelastického tělesa

Tradičně se pevnost materiálů určuje na základě měření tzv. pracovních diagramů (strain-stress curves). Při měření se těleso zatěžuje postupně se zvyšující silou až do okamžiku, kdy se poruší celistvost tělesa. Měření by měla být prováděna v ustálených stavech, tedy po doznění přechodového děje. Optimálně by se namáhání mělo nastavit na

hodnotu odpovídající měřenému bodu v pracovním diagramu. Odpovídající deformace by se měla měřit až po jejím ustálení. Možný je i opačný postup, kdy se primárně nastaví zvolená deformace a po ustálení procesu se určí namáhání. V technické praxi se u „téměř“ elastických těles, jako jsou např. kovy, měření často provádí tak, že namáhání lineárně a pomalu roste a průběžně se měří deformace. Případně opět je možno lineárně a zvolna zvyšovat deformaci a určovat odpovídající namáhání⁵.

V případě viskoelastických těles měření pracovních diagramů na základě lineárního zvyšování namáhání (či deformace) není vhodné. Vliv viskózní složky mechanického chování může vést k nesprávným výsledkům, protože není jasné, zda bylo dosaženo ustáleného stavu⁵.

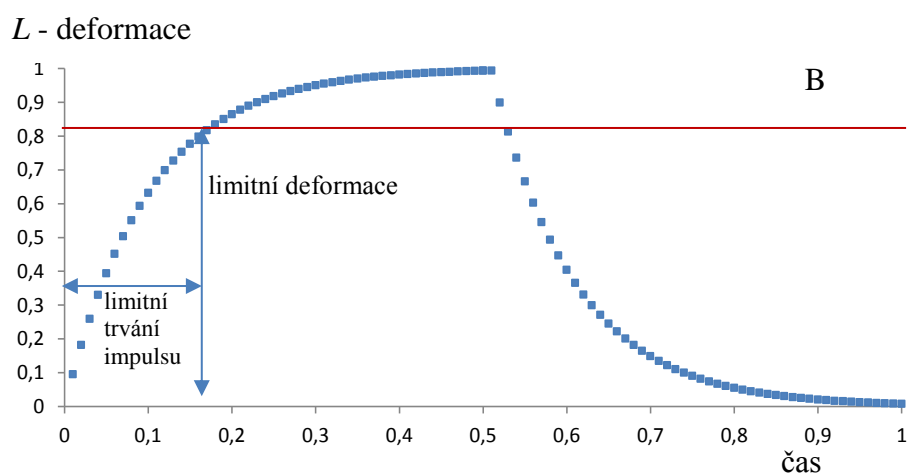
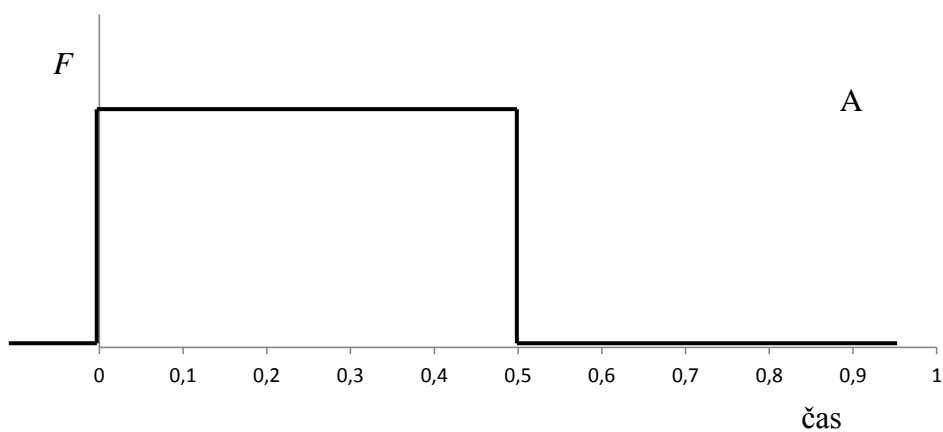
Strukturální pohled na procesy provázející destrukci těles ukazuje na význam limitní deformace. K porušení celistvosti dochází zřejmě tehdy, když deformace nabude takové velikosti, že vazby uvnitř tělesa přestanou působit. Krátkodobé působení síly i nad mezí pevnosti nemusí vést k porušení celistvosti tělesa⁵.

Čistě statické namáhání je v biomechanice výjimečný jev. Například fraktury obvykle nastávají v důsledku dynamického zatěžování. V technické praxi se dynamická pevnost často posuzuje na základě nárazových (impaktivních) testů. Princip spočívá v porovnání velikosti energie při nárazu, kterou je těleso schopno pohltit bez porušení celistvosti. Hlubší pohled na tuto metodu ukazuje, že schopnost těles pohltit energii při nárazu souvisí s viskoelastickými vlastnostmi materiálů⁵.

V biomechanice jsou klasické nárazové testy prakticky nepoužitelné. Je však možné popsat souvislost mezi dynamickou pevností a viskoelastickými vlastnostmi těles. Protože mechanické chování biologických viskoelastických struktur je nelineární, je úplné obecné řešení této problematiky velmi obtížné. Nezbytná je znalost popisu nelineární viskoelasticity a využití počítačového modelování. Nicméně pro základní odhad může s úspěchem posloužit i použití jednoduchých lineárních reologických modelů⁵.

2.2.4 Dynamická pevnost těles chovajících se podle Voigtova modelu

Dle Delteru⁵ je možno odolnost těles proti porušení při dynamickém zatěžování odhadnout na základě následující analýzy. Voigtův model je často používaná aproximace viskoelastického chování biologických struktur. Popis Voigtova modelu a analýza jeho použitelnosti jsou uvedeny v části 2.2.1.4.



Obr. 26: Křivka toku Voigtova modelu namáhaného impulsem (A+B)

Pokud je těleso namáháno obdélníkovým impulsem (Obr. 26-A), Voigtovo těleso má průběh deformace (Obr. 26-B).

Je zřejmé, že i v případě, kdy je velikost obdélníkového impulsu nad mez pevnosti a nad limitní mez deformace, k poruše nedojde okamžitě. Pokud se působení síly přeruší před dosažením limitní deformace, k porušení nedojde. Kvantitativní popis toho jevu následuje⁵.

Průběh deformace na vstupní hranu impulsu síly je

$$L(t) = \frac{F}{H} \cdot (1 - e^{-\frac{H}{N} \cdot t}).$$

Při namáhání tyče v tahu platí:

$\sigma = \frac{F}{S}$, kde S je plocha průřezu tyče, $\varepsilon = \frac{L}{L_0}$, kde L_0 je klidová délka tyče.

Platí také:

$$\varepsilon(t) = \frac{F}{E} \cdot (1 - e^{-\frac{E}{\eta} \cdot t}).$$

Pokud ze statických měření je známa limitní deformace L_{max} a pokud je síla impulsu F , pak lze určit nejdelší dobu trvání impulsu, aniž by došlo k porušení tělesa.

Deformace statická L_0 odpovídá době trvání obdélníkového impulsu rostoucím nade všechny meze⁵.

Odvození některých důležitých vztahů:

$$L_{max} = \frac{F}{H} \cdot (1 - e^{-\frac{H}{N} \cdot t_{max}}),$$

$$L_{max} = L_0 \cdot (1 - e^{-\frac{H}{N} \cdot t_{max}}),$$

$$L_0 = \frac{F}{H},$$

$$t_{max} = \frac{N}{H} \cdot \ln\left(\frac{F}{F + HL_{max}}\right),$$

a také
$$t_{max} = \frac{N}{H} \ln \frac{L_0}{L_0 + L_{max}}.$$

Interpretace výše uvedených vztahů však není snadná⁵.

Přehlednější je vyjádření „odolnosti“ proti porušení v dynamickém zatěžování tak, že se porovnává teoretická deformace v ustáleném stavu (L_0) s deformací dosaženou na konci zatěžování obdélníkovým impulsem (L_{max}). Deformace L_{max} je vždy menší než deformace L_0 ⁵:

$$\frac{L_{max}}{L_0} = 1 - e^{-\frac{H}{N} \cdot t_{max}},$$

$$\frac{L_{max} - L_0}{L_0} = -e^{-\frac{H}{N} \cdot t_{max}},$$

$$\frac{L_0 - L_{max}}{L_0} = e^{-\frac{H}{N} \cdot t_{max}}.$$

Relativní zvýšení odolnosti je dáno vztahem:

$$K = \frac{\Delta L}{L_0} = e^{-\frac{H}{N} t_{\max}}.$$

Relativní zvýšení odolnosti v procentech:

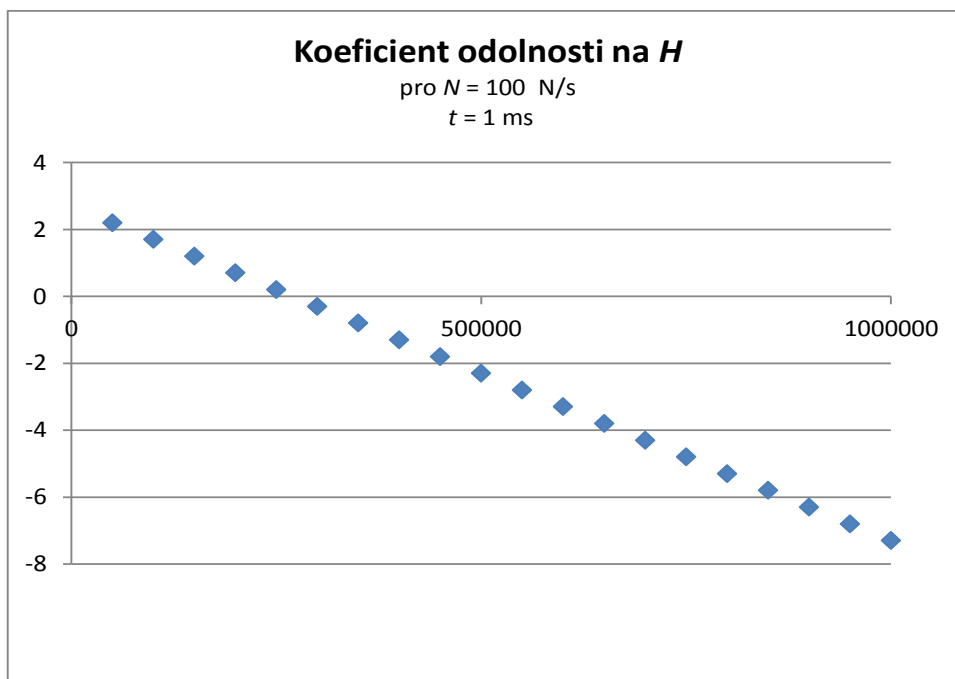
$$K(\%) = 100 \cdot e^{-\frac{H}{N} t_{\max}}.$$

Přehlednější interpretaci poskytuje vyjádření v logaritmickém měřítku, které se označí jako koeficient odolnosti k :

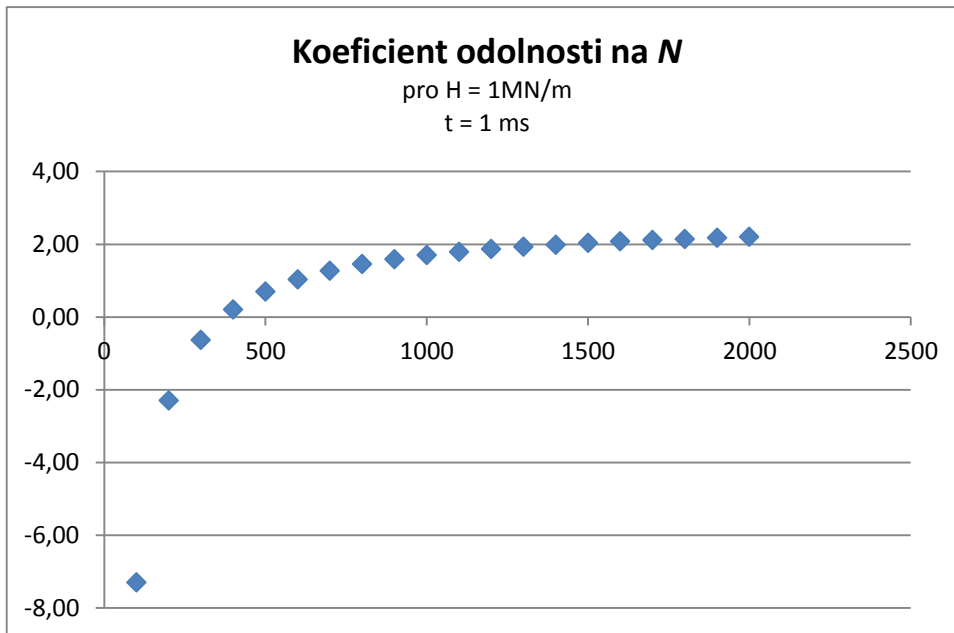
$$k = \ln K(\%), \quad k = 2,7 - \frac{H}{N} t_{\max}.$$

Čím je větší koeficient k , tím je větší odolnost proti porušení celistvosti tělesa.

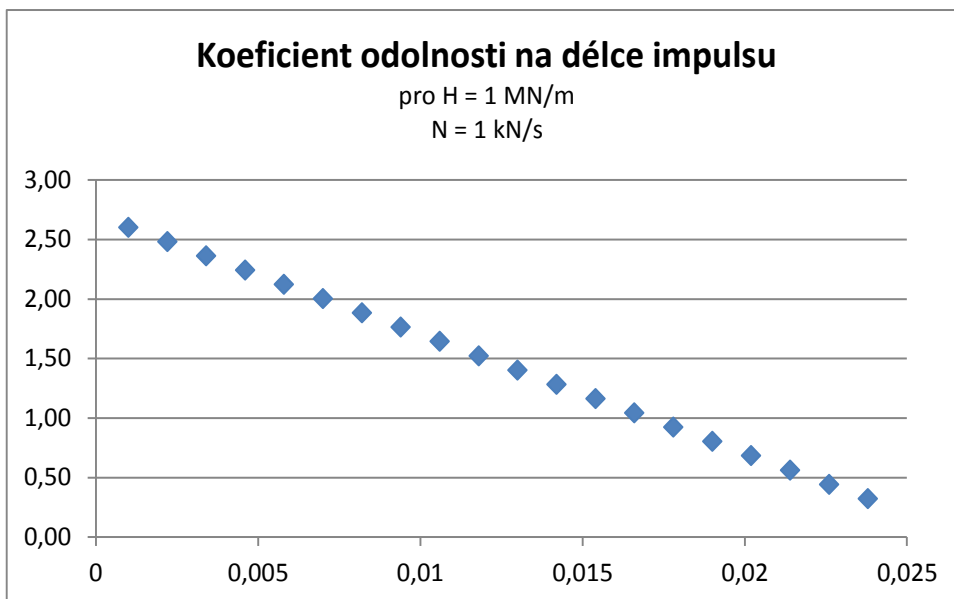
Pro ilustraci následuje grafické znázornění vlivu jednotlivých parametrů (H , N , t_{\max}) na koeficient k^5 .



Graf 1: Závislost koeficientu odolnosti (k) na H



Graf 2: Závislost koeficientu odolnosti (k) na N



Graf 3: Závislost koeficientu odolnosti (k) na délce impulsu

Shrnutí:

- 1) Viskózní složka zvyšuje odolnost proti porušení.
- 2) Tuhost snižuje odolnost proti porušení.
- 3) Doba trvání impulsu snižuje odolnost proti porušení. Čím kratší impuls, tím větší odolnost (vyjadřuje se pomocí poměru $N/H = \text{časová konstanta}$)⁵.

Dynamická pevnost těles obecně

Reálně se tělesa chovají s většími či menšími odchylkami proti Voigtovu modelu. U biologických struktur je mechanické chování zpravidla významně nelineární. Řešení nelze odvodit jednoduše analyticky a je možné jen na základě znalosti nelineárně viskózního chování a je nutné použít matematických modelů a numerických metod ve spojení s výpočetní technikou.

Kvalitativní závěry plynoucí z Voigtova modelu lze však pro orientační úvahy použít⁵.

2.2.5 Přístroje pro dynamická měření

Pro dynamická měření se používají přístroje:

- DMA (Dynamical Mechanical Analyzer)
- RMA (Rezonance Mechanical Analyzer)

2.2.5.1 Přístroje pro dynamická měření – DMA

Přístroje pro dynamická měření – DMA – jsou součástí výrobního programu předních světových výrobců testovacích přístrojů a nabízejí širokou variabilitu typů měření a oborového použití, výrobci nabízejí modely stolní i volně stojící, pro rozsáhlá měření jsou k dispozici celé soustavy měřicích aparatur tak, aby bylo možné měřit velké soubory vzorků s maximálním využitím automatizace. Standardem je automatické řízení a velká variabilita ve vyhodnocování získaných dat pomocí firemních softwarů⁶.

U přístrojů typu DMA předního výrobce firmy Perkin Elmer (USA) existuje celá řada variant přístrojů, včetně kompaktních modelů. Testování vzorků je možné provádět v kontrolovaném prostředí (teplota, vlhkost) a současně se stanovením mechanických vlastností je tak možné získat doplňující informace o deformacích, únavě materiálu atd⁶.



Obr. 27: Kompaktní univerzální přístroj DMA firmy Perkin Elmer

2.2.5.2 Přístroje pro dynamická měření – RMA

Přístroj vyvinutý na farmaceutické fakultě – DELTER lze použít pro dynamická měření – RMA. Z měření a následné analýzy rezonanční křivky i průběhu vlastních kmitů lze dospět k důležitým informacím o viskoelastických parametrech mechanické soustavy. Na tomto principu je například založena metodika popisovaná v normě ČSN ISO 6721-3 (Ohybové kmitý – Metoda rezonanční křivky)²². Jedná se o přesnou, citlivou a levnou metodiku měření mechanického chování viskoelastických těles, v tomto případě kostí při dynamickém zatěžování⁵.

Mechanická rezonance

Pojem mechanická rezonance je klasicky definován jako stav, kdy amplituda ustáleného vynuceného kmitání (rezonanční křivka) dosahuje maxima. Tomuto stavu odpovídá rezonanční frekvence mechanického systému. Rezonanční křivka je tedy závislost deformace na frekvenci budícího namáhání (o konstantní amplitudě), obvykle síly. Vlastní kmitý mechanické soustavy nastávají při jednorázovém vnesení energie do systému (například krátkým impulsem síly). Frekvence vlastních kmitů odpovídá rezonanční frekvenci. Tlumení vlastních kmitů soustavy závisí na ztrátách energie během kmitání. Závislost deformace na frekvenci konstantního budícího namáhání však nemusí obsahovat žádné maximum. Maximální hodnota deformace je při nulové frekvenci a s rostoucí frekvencí klesá. Mechanický systém pak nemá rezonanci a nevyskytují se u něj vlastní kmitý²².

Rezonanční křivka

Elementární informace je popsána na Wikipedii³⁴, pro kvantitativní popis však zdaleka nepostačuje. Přehledný a dostatečně přesný popis lze však získat na základě aplikace Laplaceovy či Fourierovy transformace (operátorového počtu) na základní diferenciální rovnici lineárních mechanických soustav.

Základní rovnice, která popisuje vztahy mezi vstupem a výstupem u lineárních či linearizovatelných mechanických systémů, má následující tvar:

$$a_0 L + \sum_{i=1}^n a_i L^{(i)} = b_0 F + \sum_{j=1}^m b_j F^{(j)},$$

kde L je deformace, F je namáhání. i a j jsou stupně derivace⁶.

Aplikace Fourierovy transformace vede k rovnici:

$$\left(a_0 + \sum_{i=1}^n a_i (i\omega)^i \right) L(i\omega) = \left(b_0 + \sum_{j=1}^m b_j (i\omega)^j \right) F(i\omega),$$

kde $i\omega$ je nová proměnná (místo času t), i je komplexní jednotka a $L(i\omega)$, $F(i\omega)$ jsou Fourierovy obrazy veličin $L(t)$, $F(t)$.

Komplexní tuhost $T(\omega)$ je poměr fázorů síly a deformace⁶

$$T(i\omega) = \frac{F(i\omega)}{L(i\omega)}.$$

Platí pro ni vztah:

$$T(i\omega) = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i (i\omega)^i.$$

Komplexní tuhost sestává z reálné a imaginární části (viz kapitola 2.2.2.1). Reálnou a imaginární část i absolutní hodnotu tuhosti lze určit na základě měření frekvenční charakteristiky (řešení inverzního problému).

Absolutní hodnota dynamické tuhosti je $|T(\omega)| = \sqrt{T_{RE}^2 + T_{IM}^2}$. Udává poměr amplitud harmonické budicí síly a harmonické deformace. Tedy frekvenční amplitudovou charakteristiku mechanické soustavy. Protože rezonance nastává tehdy, je-li amplituda deformace maximální, znalost vztahu popisujícího komplexní tuhost umožňuje určit rezonanční frekvence⁶.

Postupuje se tak, že se hledá minimum pro $|T(\omega)|$ v závislosti na frekvenci. Tedy pro stav, kdy $\frac{d}{d\omega}|T(\omega)|=0$.

Počet lokálních minim může být obecně libovolný. Resonanční frekvence takto stanovené odpovídají frekvenci vlastních kmitů tělesa.

U Voigtova modelu k rezonanci nedochází, má minimum při nulové frekvenci, tedy při statickém zatěžování. U většiny reálných mechanických systémů se vyskytuje omezený počet minim. Vysvětlení tohoto jevu lze nalézt v analýze závislosti deformace na frekvenci. Pro deformaci platí⁶:

$$L(i\omega) = \frac{F(i\omega)}{T(i\omega)}$$

Pokud je budící síla konstantní, například pro jednoduchost jednotková, pak

$$L(i\omega) = \frac{1}{T(i\omega)}, \quad \text{a také} \quad L(i\omega) = \frac{1}{a_0 + \sum_{i=1}^n a_i (i\omega)^i}.$$

Předchozí vztah lze upravit takto:

$$L(i\omega) = \frac{A_1}{i\omega + \alpha_1} + \frac{A_2}{i\omega + \alpha_2} + \dots + \frac{B_1}{i\omega + \beta_1 - \gamma_1\omega^2} + \frac{B_2}{i\omega + \beta_2 - \gamma_2\omega^2} \dots,$$

kde členy s B odpovídají dílčím deformacím vykazujícím maxima a vlastní kmitů.

Celkovou deformaci lze tedy považovat za součet dílčích deformací.

$$L(i\omega) = L_1(i\omega) + L_2(i\omega) + L_3(i\omega) + \dots.$$

Při jednotkové budící síle také platí:

$$L(i\omega) = \frac{A_1}{T_1(i\omega)} + \frac{A_2}{T_2(i\omega)} + \frac{A_3}{T_3(i\omega)} + \dots$$

S rostoucí frekvencí rostou dílčí tuhosti a klesají dílčí deformace. Čili váha dílčích deformací klesá s frekvencí⁶.

Vlastní kmity mechanické soustavy

Vlastní kmity soustavy nastávají při určité kombinaci parametrů tehdy, když se do soustavy vnese krátkým impulsem energie. K řešení problémů vzniku a popisu vlastních kmitů je vhodné použít Laplaceovu transformaci⁶.

Aplikace Laplaceovy transformace na základní diferenciální rovnici vede k rovnici:

$$\left(a_0 + \sum_{i=1}^n a_i (p)^i \right) L(p) = \left(b_0 + \sum_{j=1}^m b_j (p)^j \right) F(p),$$

kde p je nová proměnná (místo času t) a $L(p)$, $F(p)$ jsou Laplaceovy obrazy veličin $L(t)$, $F(t)$. Z teorie je známo, že Laplaceův obraz krátkého „jednotkového“ impulsu je roven jedné. Platí tedy

$$\left(a_0 + \sum_{i=1}^n a_i (p)^i \right) L(p) = 1.$$

Při znalosti koeficientů v předchozí rovnici lze pomocí zpětné Laplaceovy transformace dospět k časovému průběhu deformace při vlastních kmitech. U většiny reálných mechanických systémů mají vlastní kmity charakter harmonických tlumených kmitů⁶:

$$L(t) = L_0 e^{-k \cdot t} \cdot \sin(\omega t).$$

To odpovídá řešení rovnice:

$$L(p) = \frac{1}{a_0 + a_1 p + a_2 p^2}.$$

U Voigtova modelu se setrvačným členem M :

$$L(p) = \frac{1}{H + Np + Mp^2}.$$

Pro tlumení vlastních kmitů platí: $k = \frac{a_1}{2a_2}$.

U Voigtova modelu se setrvačným členem: $k = \frac{N}{2M}$.

Pro frekvenci vlastních kmitů platí: $\omega = \frac{\sqrt{4a_0 \cdot a_2 - a_1^2}}{2a_2}$.

U Voigtova modelu se setrvačným členem: $\omega = \frac{\sqrt{4M \cdot H - N^2}}{2M}$.

Voigtův model se setrvačným členem není sice obecným modelem mechanického chování, ale „sériová“ kombinace několika Voigtových modelů doplněných setrvačnými členy představuje již zcela obecně strukturu lineárních a linearizovatelných těles^{5,6}.

2.2.5.3 Závěry

Měření frekvenční amplitudové charakteristiky i měření průběhu vlastních kmitů umožňují určení koeficientů základní rovnice, a tedy řešení tzv. inverzního problému. To je určení koeficientů základní rovnice a následně i výpočet komplexní tuhosti a komplexních modulů. Znalost komplexní tuhosti nebo komplexního modulu umožňuje i řešení přímého problému. To je určení průběhu vlastních kmitů a průběhu frekvenční (amplitudové i fázové) charakteristiky. Použití rezonanční metody je možné jen tehdy, pokud k rezonanci dochází. To je tehdy, pokud platí⁵:

$$4M \cdot H - N^2 > 0.$$

Pokud systém nekmitá, tj. samotný systém nemá rezonanci, je nejjednodušší docílit rezonance spojením měřeného tělesa se setrvačným členem tak, aby podmínka rezonance byla splněna. Je také praktické, aby setrvačné těleso bylo umístěno na konci tělesa a aby hmotnost setrvačného členu byla významně větší, než je hmotnost samotného tělesa. Tím se omezí nepřesnost vlivem nepřesné znalosti těžiště tělesa^{5,6}.

Model systému těleso-setrvačný člen je sériová kombinace Voigtových členů se setrvačnými členy, viz Obr. 19.

Rovnice pro jeho chování je:

$$L(i\omega) = \left(\frac{B_1}{i\omega + \beta_1 - \gamma_1 \omega^2} + \frac{B_2}{i\omega + \beta_2 - \gamma_2 \omega^2} + \dots \right) F(i\omega).$$

Na základě měření frekvence a tlumení vlastních kmitů systému těleso-setrvačný člen lze určit parametry výše uvedené rovnice a následně i parametry jednotlivých složek modelu podle Obr. 19 a také komplexní tuhost samotného tělesa. Na tomto základě pracují rezonanční přístroje. Software, který je součástí těchto přístrojů, určuje na základě výše popsané teorie parametry H a N automaticky. Dále software určuje komplexní tuhost a komplexní modul samotného tělesa⁵.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Příprava biologického materiálu

Pro experimentální účely byla jako měřený vzorek zvolena pravá hrudní končetina prasete domácího (lat. os metacarpale quartum dextrum). Staří prasete bylo v den porážky přibližně 6 měsíců. Jateční závod firmy Chovservis – Toro Hlavečnick vyhověl požadavku, aby prasečí nožky nebyly jakkoli jatečně upraveny (tepelně pařeny). Ihned po převzetí byly končetiny naloženy do fyziologického roztoku a následně uloženy v chladicím zařízení o teplotě 7 °C. Před vlastním měřením bylo potřeba vzorek kosti vypreparovat z končetiny prasete. Přístroj byl přizpůsobený k upnutí vzorků dlouhých asi 20 až 50 mm. Proto byly preparováním získány vzorky kosti dlouhé asi 25 mm, široké asi 8 mm a vysoké asi 2,5 mm. Vzhledem k velikosti zvolené prasečí kosti (os metacarpale quartum) byly toto maximální rozměry, které bylo možné preparováním získat. Díky složitosti preparování (řezání, oddělování, čištění a broušení) a rozmanitosti samotných kostí nebylo možné získat absolutně stejné rozměry jednotlivých vzorků. Během měření byly vzorky kostí zvlhčovány fyziologickým roztokem.

Experimentální část se skládala ze dvou samostatných měření nazývaných pro účely této práce 1. sérií a 2. sérií. V obou sériích byly měřeny impulsní charakteristiky z harmonických tlumených kmitů kostních vzorků. V 1. sérii se měřilo s 8 kostními vzorky, v 2. sérii se pracovalo s 5 odlišnými vzorky.



Obr. 28: Vzorky měřených kostí

3.1.2 Experimentální měření 1. série

Pro měření bylo vybráno 8 vzorků kostí z prasete domácího, které byly v den porážky vypreparovány. Vzorky byly jednotlivě uloženy ve fyziologickém roztoku v Petriho miskách označených pořadovými čísly 1 až 8. Před měřením byla teplota vzorků vytemperována na teplotu laboratorní místnosti tj. 22 °C. Vlastní experimentální měření začalo v den 0, což bylo 7 hodin po porážce.

Délka upnutí všech vzorků byla v přístroji Delter pro každé jednotlivé měření změřena posuvným měřidlem. Snahou bylo vzorek kosti upnout co nejpřesněji vždy pokud možno do stejné pozice jako v předchozím měření. Na jednotlivé vzorky byly naznačeny pomocné rysky fixem, aby pozice upnutí byla pokud možno stejná. Z tabulek vyplývá, že rozměry vzorku jsou relativně malé, proto ne vždy bylo dosaženo stejného upnutí vzorku do přístroje. Každá nová změřená délka byla zapsána do tabulky 1 a byla vložena do software na PC.

Vzorek č.	Délka	Šířka	Výška
1	22,9 mm	6,5 mm	1,95 mm
2	27,5 mm	7,0 mm	2,6 mm
3	32,0 mm	7,4 mm	2,1 mm
4	27,4 mm	7,2 mm	3,4 mm
5	33,6 mm	6,4 mm	2,9 mm
6.	30,8 mm	6,1 mm	3,0 mm
7.	28,8 mm	7,6 mm	3,2 mm
8.	29,8 mm	6,7 mm	3,0 mm

Tabulka 1: Rozměry připravených vzorků

Použitá kost:	pravá hrudní končetina – 4. prst (os metacarpale quartum)
Počet vzorků:	8
Hmotnost sondy:	44,529 g

Tabulka 2: Příprava vzorků pro 1. sérii

Časový odstup od porážky	0	1 den	3 dny	7 dnů	15 dnů
Vzorek č.	Délka pro 1. měření	Délka pro 2. měření	Délka pro 3. měření	Délka pro 4. měření	Délka pro 5. měření
1.	15,0 mm	15,0 mm	15,0 mm	15,2 mm	15,0 mm
2.	16,1 mm	16,1 mm	16,1 mm	16,0 mm	16,3 mm
3.	15,8 mm	16,0 mm	16,1 mm	16,0 mm	16,0 mm
4.	15,5 mm	15,5 mm	15,2 mm	15,2 mm	15,5 mm
5.	15,9 mm	15,5 mm	15,8 mm	15,8 mm	15,2 mm
6.	16,1 mm	16,1 mm	16,4 mm	16,2 mm	16,6 mm
7.	15,8 mm	16,1 mm	16,3 mm	16,1 mm	15,6 mm
8.	17,4 mm	17,8 mm	17,8 mm	17,6 mm	17,4 mm

Tabulka 3: Rozměry upnutí v přístroji RMA Delter pro jednotlivá měření v 1. sérii

3.1.3 Experimentální měření 2. série

Prasečí nožky byly v den porážky dovezeny ve fyziologickém roztoku na Farmaceutickou fakultu UK HK. Stejný den byly vypreparovány měřené vzorky kostí a jednotlivě uloženy ve fyziologickém roztoku v Petriho miskách označenými pořadovými čísly 1 až 5 v chladicím zařízení při teplotě 7 °C.

Použitá kost:	pravá hrudní končetina – 4. prst (os metacarpale quartum)
Počet vzorků:	5
Úroveň napětí:	40 mV
Tuhost pružiny (H):	380 N/m

Tabulka 4: Příprava vzorků a nastavené parametry

Měření probíhalo druhý den (od porážky) a teplota vzorků byla vytemperována na teplotu laboratorní místnosti, tj. 21 °C. Před začátkem měření byly posuvným měřítkem změřeny jednotlivé vzorky kostí, které jsou zaznamenány v tabulce 5 a zvážena hmotnost sondy a jednotlivých závaží. Hmotnost sondy spolu s jednotlivými závažími je uvedena v tabulce 6.

Vzorek č.	Délka	Šířka	Výška
1	25,6 mm	9,35 mm	3,2 mm
2	25,3 mm	9,1 mm	3,3 mm
3	26,2 mm	8,6 mm	2,1 mm
4	25,2 mm	9,1 mm	2,2 mm
5	26,3 mm	10,0 mm	3,2 mm

Tabulka 5: Rozměry vzorků kostí

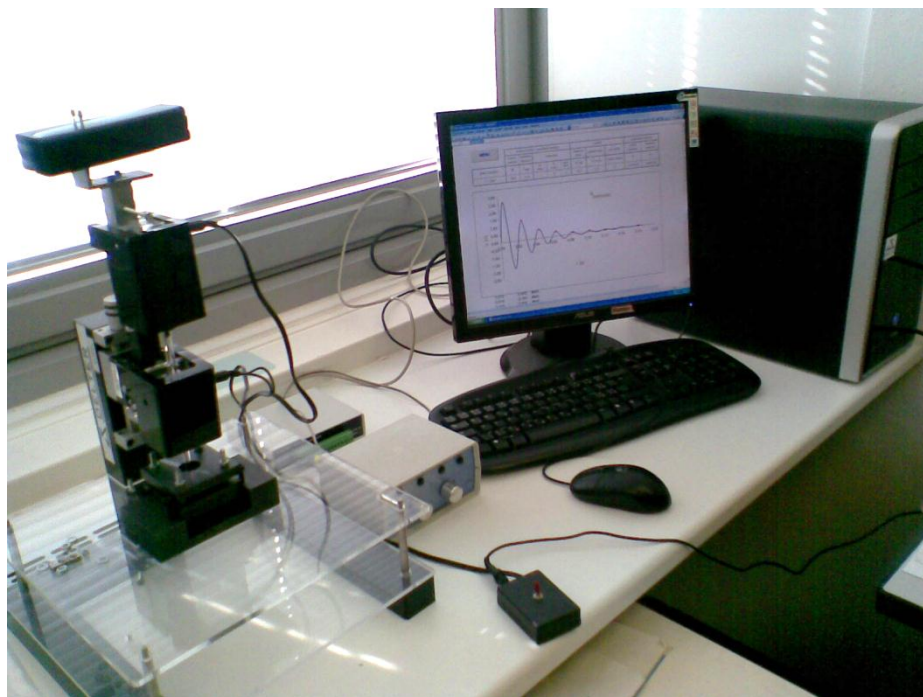
3.2 Metody

3.2.1 Měřicí aparatura RMA

K experimentálnímu měření vzorků kostí byl použit viskoelastometr Delter (obr. 29), který byl navržen katedrou biofyziky Farmaceutické fakulty UK HK. Obě série měření na tomto přístroji byly provedeny rezonanční metodou RMA. Jedná se o variabilní zařízení pro stanovení především dynamických vlastností biologických materiálů a plastických a pryžových materiálů s širokou možností aplikací v oborech biomechaniky, medicíny a průmyslu⁶.

Originální software vyvíjený spolu s přístroji umožňuje měření na základě nejnovějších poznatků v teorii chování materiálů, zejména z hlediska jejich viskoelastických vlastností tak, aby bylo možné měřené hodnoty co nejvíce aplikačně přiblížit reálnému chování vzorků⁶.

U přístrojů je použita klasická koncepce, obdobná u většiny zkoušecích přístrojů, tvořená mechanickou částí pro upnutí a měření vzorku, elektronikou pro zpracování signálu a počítačem vybaveným příslušným softwarem⁶.



Obr. 29: Sestava viskoelastometru Delter s mechanickou částí, elektronikou a počítačem vybaveným originálním softwarem

Viskoelastometr Delter je vyvíjen od roku 2002 a z počátku byl zamýšlen pro měření in vivo parametrů lidské kůže, později se přidaly aplikace pro měření tkání a biologických materiálů in vitro a použití přístroje bylo následně rozšířeno na všeobecné a univerzální měření vzorků a materiálů v tlaku, tahu, ohybu a experimentálně i krutu⁶.

Softwarové zpracování dat:

Samotný výpočet zajišťuje program v aplikaci Excel s použitím programovacího jazyka Visual Basic. Program je navržen pro výpočet a zpracování charakteristik viskoelastických materiálů a byl rovněž vyvinut katedrou biofyziky Farmaceutické fakulty UK HK. Data přijímá z analogově-digitálního převodníku UDAQ-1208.

3.2.2 Měřicí sestava pro 1. sérii měření

Toto měření mělo za cíl ověřit dva fakty. Za prvé, že v čase (stárnutí) nedochází k výrazným změnám viskoelastických vlastností měřených vzorků. Za druhé, že viskoelastické charakteristiky kostí se chovají lineárně nebo případně jsou do určité míry po částech linearizovatelné. Jednotlivé odstupny měření byly zvoleny v přibližně logaritmické řadě v rozsahu 0 až 15 dnů.

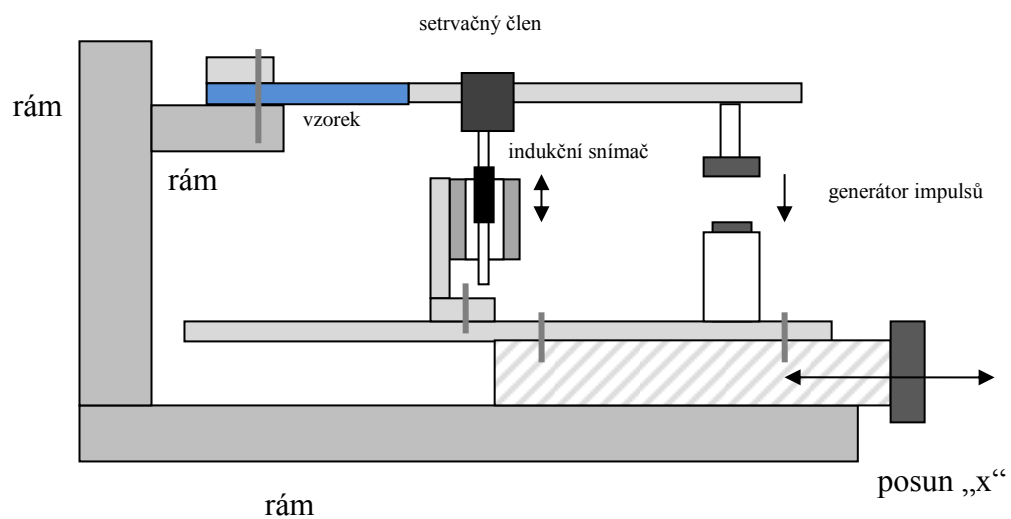
Pro měření byla použita měřicí sestava podle Obr. 30 a Obr. 31. Přístrojem byly změřeny průměrné hodnoty tlumení amplitud a frekvence za určitý časový úsek. Kompenzace ohybu vzorku vlivem tíhy sondy nebyla brána v úvahu, neboť je při malých ohybech nevýznamná.

Hmotnost setrvačného členu pro 1. sérii se rovnala hmotnosti sondy (nebylo použito žádné závaží).

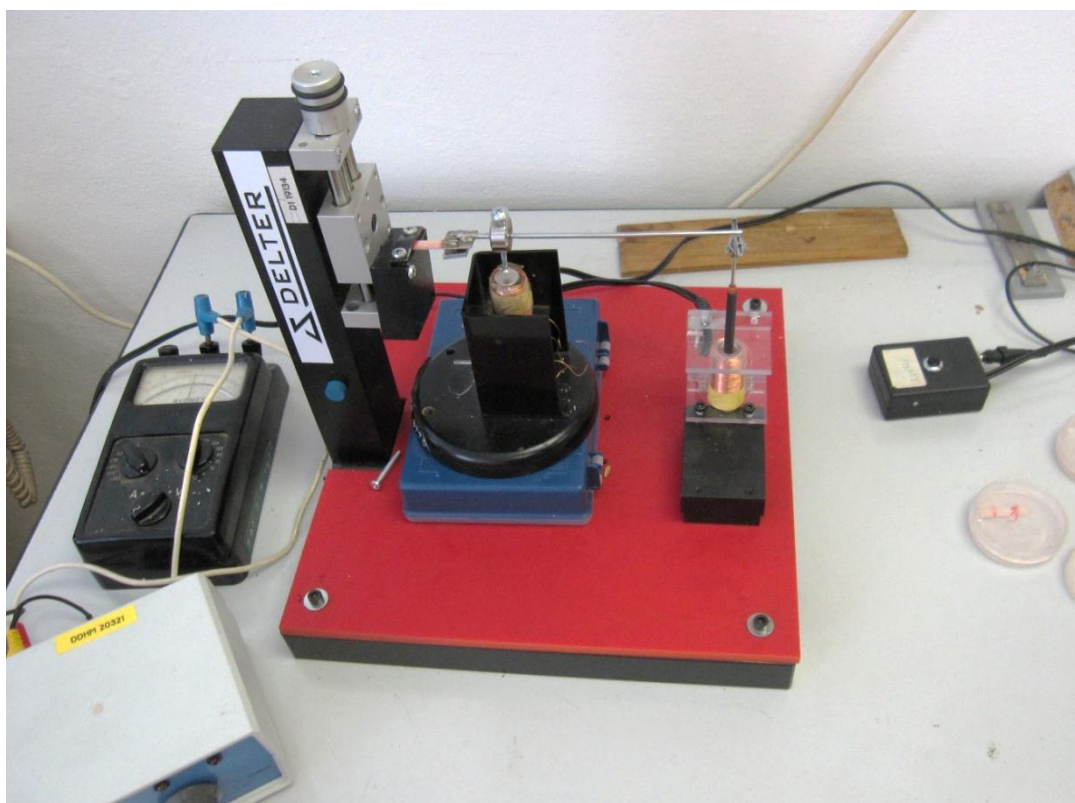
Použitý postup měření pro 1. sérii:

1. Vzorek byl upnut do pevného rámu, změřila se délka upnutí v přístroji.
2. Generátorem impulsů (silou elektromagnetu na konci sondy) se vzorek rozkmital.
3. Získaný signál se z indukčního snímače pomocí elektroniky převedl na napětí, zesílil a přes A/D převodník převedl do počítače.
4. Software z naměřených hodnot vypočetl komplexní tuhost vzorku a komplexní modul pružnosti.
5. Měření se opakovalo 10x se stejným vzorkem.
6. Tento postup se opakoval pro všech 8 vzorků a pro každý den měření.

Z 8 vzorků kostí bylo získáno 400 hodnot (80 hodnot za 1 den měření, celkem 5 dnů, viz Tabulka 3). Záměrně byl zvolen větší počet jednotlivých měření, aby se pokud možno vyloučily chyby metody měření a zpracování (především způsob upnutí vzorku).



Obr. 30: Schéma měřicí sestavy pro 1. sérii



Obr. 31: Měřicí sestava pro 1. sérii

3.2.3 Měřicí sestava pro 2. sérii měření

Cílem měření bylo získat frekvenční závislosti parametrů vzorků při konstantním předpětí. Proto byla měřicí sestava na rozdíl od 1. série upravena do mírně složitější konfigurace, viz Obr. 32 a Obr. 33. Do sestavy bylo vloženo závaží a kompenzační pružina. Její tah byl pokaždé nastaven tak, aby kompenzoval tíhu závaží. Předem byla určena hmotnost sondy a jednotlivých závaží použitých pro měření. Hmotnost sondy spolu s jednotlivými závažími je uvedena v Tabulce 6.

Postup měření byl podobný jako pro 1. sérii s rozdílem, že pro každý vzorek bylo provedeno 5 opakování pro každou konfiguraci závaží (viz Tabulka 6):

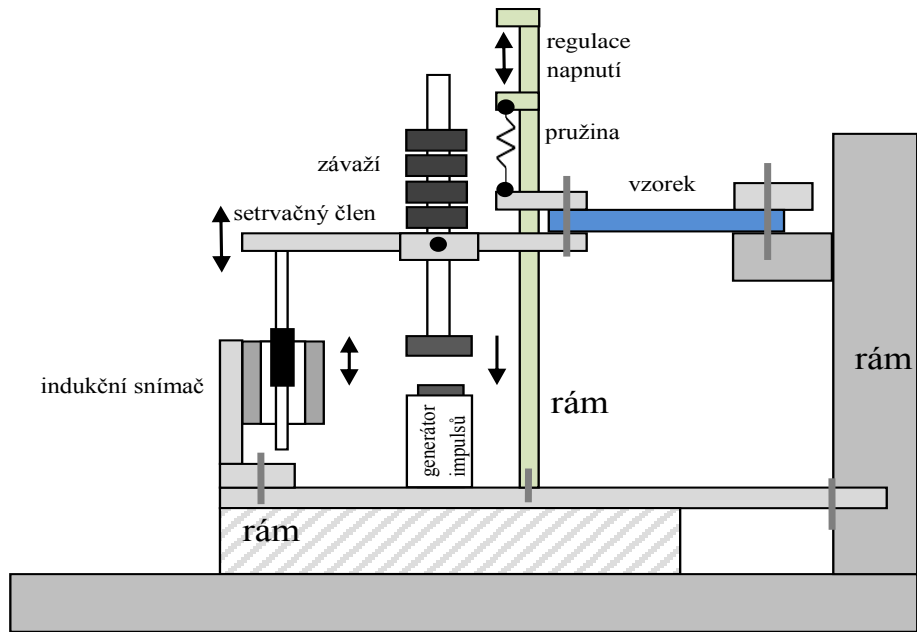
1. měření provedeno pouze s hmotností sondy.

2. až 6. měření provedeno spolu se závažími označenými pořadovými číslicemi 1 až 5.

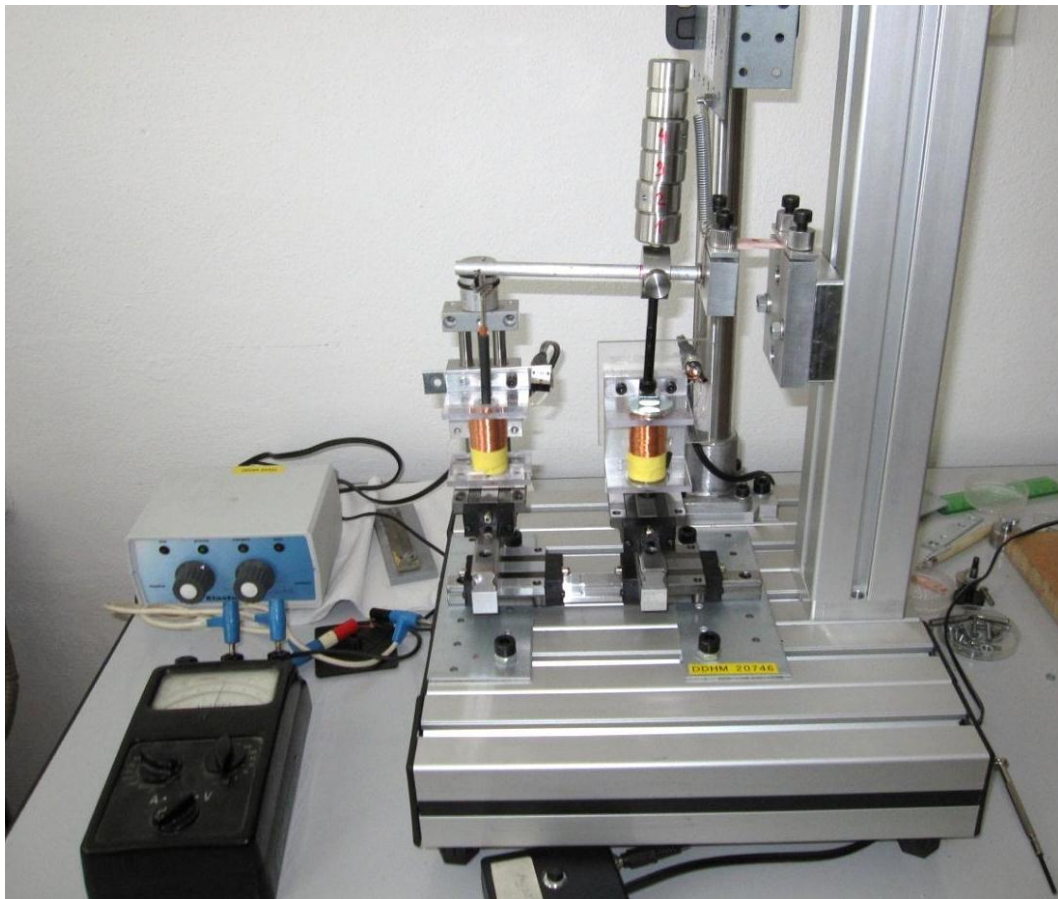
Závaží pro 6. měření bylo složeno ze dvou kusů závaží o celkové hmotnosti 82,24 g. Z 5 vzorků kostí bylo získáno 150 hodnot (30 hodnot pro každý vzorek a pro 6 variant závaží).

Pořadí měření	Popis	Hmotnost	Celková hmotnost včetně sondy
1.	Sonda	241,60 g	241,60 g
2.	Závaží 1	60,40 g	302,00 g
3.	Závaží 2	60,40 g	362,40 g
4.	Závaží 3	60,46 g	422,86 g
5.	Závaží 4	60,48 g	483,34 g
6.	Závaží 5	82,24 g	565,58 g

Tabulka 6: Hmotnost sondy a závaží pro měření



Obr. 32: Schéma měřicí sestavy pro 2. sérii



Obr. 33: Měřicí sestava pro 2. sérii

4 KLINICKÁ ČÁST

4.1 Pilotní studie

4.1.1 Pacienti

V pilotní studii byly vyhodnoceny lékařské záznamy 19 dětí (12 chlapců a 7 dívek; průměrný věk 14.9 ± 3.3 roků). Diagnostické rozdělení pacientů se dělilo na: osteogenesis imperfecta (n=3) a neadekvátní snížení kostní denzity/osteoporózu neznámého původu (n=16).

Vstupní kritéria pro zařazení do retrospektivní pilotní studie:

- Nejméně dvě prevalentní nízkozátěžové zlomeniny v osobní anamnéze; a/nebo:
- Nízká denzita kostního minerálu v bederní páteři (L1-L4 BMD): pod -2 SD Z-skóre

Kritérium pro nezařazení do studie:

- Užívání léků ovlivňujících kostní metabolismus v době hodnocení

Všichni pacienti požívali standardní středoevropskou stravu sestávající zvláště z masa a karbohydrátů. Žádný pacient neměl stravu s omezením vitamínu B či potravin, které jej obsahují, ani neužíval nadměrné dávky vitamínu B.

4.1.2 Procedury

U všech 19 pacientů byla vyhodnocena následující data:

- Hladina homocysteinu v séru (S-Hcy)
- Sérové hladiny kalcia (S-Ca) a fosforu (S-P)
- Hladina dusíku močoviny v séru
- Sérová hladina kreatininu
- Ukazatele kostní formace: sérová hladina alkalické fosfatázy (S-ALP)
- Ukazatele kostní resorpce: hladina CrossLaps v séru
- Denzita kostního minerálu v bederní páteři (L1-L4 BMD)
- Tělesná výška

Biochemické parametry byly vyšetřeny z jednorázového vzorku krve, který byl odebrán ráno nalačno.

4.1.3 Metodika

Denzita kostního minerálu (BMD) byla změřena na bederní páteři (obratle L1-L4) metodou rentgenové absorpciometrie o dvou energetických hladinách (dual-energy X-ray absorptiometry – DXA; přístroj Lunar GE) v den krevního odběru. Přesnost měření, vyjádřena jako variační koeficient, byla 1,0 %.

Hladina **homocysteinu** v séru byla měřena chemiluminescencí (Immulite 2500 immunoassay system, Siemens Healthcare Diagnostics, Německo) a vyjádřena v mol/L. Chyba měření mezi jednotlivými soupravami (interassay variation) byla 2,06 % u vzorků s S-Hcy 7,43 $\mu\text{mol/L}$; 1,99 % u vzorků s S-Hcy 10,31 $\mu\text{mol/L}$, a 1,72 % u vzorků s S-Hcy 22,25 $\mu\text{mol/L}$.

Kalcémie a **fosfatémie** byly vyšetřeny kolorimetricky a hodnoty vyjádřeny v mmol/L.

Aktivita **alkalické fosfatázy** v séru byla měřena kolorimetricky a hodnoty vyjádřeny v $\mu\text{kat/L}$.

Hladina **CrossLaps (S-CTx)** v séru byla měřena elektrochemiluminescencí (electrochemiluminescence immunoassay – ECLIA system, Elecsys-Cobas analyzátor) a vyjádřena v ng/L.

Tělesná výška byla měřena v den příslušného krevního odběru s přesností 0,5 cm na kalibrovaném stadiometru.

4.2 Rozšířená studie

Rozšířená studie navazovala na pilotní studii. V tomto klinickém hodnocení byla rozšířena vyšetřovaná skupina dětí a dorostenců s prevalentními nízkozátěžovými zlomeninami a nízkou BMD, kde byl hodnocen S-Hcy a jeho vztah k ukazatelům kostního obratu, k některým biochemickým a klinickým parametrům.

4.2.1 Pacienti

Pro rozšířenou studii byly vybrány lékařské záznamy celkem 37 dětí a dorostenců (22 chlapců a 15 dívek; věkové rozmezí 7-20 let; průměrný věk $13,9 \pm 3,5$ let).

Vstupní kritéria pro zařazení do retrospektivního hodnocení:

- Věk 5 - 19 let
- Nejméně dvě prevalentní nízkozátěžové zlomeniny v osobní anamnéze nebo
- Nízká denzita kostního minerálu v bederní páteři (L1-L4 BMD): pod -2 SD Z-skóre

nebo

- Kombinace obou

Byly též vyhodnoceny záznamy čtyř dětí s méně než dvěmi prevalentními frakturami a s nízkým BMD (pod -2 SD Z-skóre).

U těchto čtyř dětí byla změřena BMD z následujících důvodů:

- U jednoho chlapce bez prevalentních zlomenin byla BMD změřena vzhledem k přítomnosti rizikových faktorů kostní fragility a fraktury (celoživotní imobilizace po krvácení do centrálního nervového systému).
- U dvou dívek bez anamnézy zlomenin byla BMD změřena na základě radiologova podezření na osteoporózu při rentgenovém vyšetření končetin, které bylo provedeno z indikace chirurga u poranění měkkých tkání.
- U jedné dívky po pouze jedné nízkozátěžové fraktuře femuru.

Kritéria pro nezařazení do studie:

- Užívání léků ovlivňujících kostní metabolismus (alfakalcidol, kalcitriol, dihydrotachysterol, bisfosfonáty, glukokortikosteroidy, anabolické steroidy, antiepileptika, thiazidová diuretika, furosemid, thyroidní hormony, růstový hormon, heparin, warfarin) v době hodnocení či kdykoliv před tím
- Diabetes mellitus
- Celiakie
- Idiopatické záněty střevní
- Autoimunitní onemocnění
- Cushingův syndrom

- Chronická renální insuficience
- Hyperkalciurie
- Urolitiáza
- Hypotyreóza
- Hypertyreóza
- Hyperparatyreóza
- Hypoparatyreóza
- Pseudohyperparatyreóza

Všichni pacienti požívali standardní střeoevropskou stravu sestávající zvláště z masa a karbohydrátů. Žádný pacient neměl stravu s omezením vitamínu B či potravin, které jej obsahují, ani neužíval nadměrné dávky vitamínu B. Jeden obézní chlapec trpěl hypertenzí a byl léčen enalapilem. Ostatní děti měly krevní tlak v rozmezí referenčních hodnot.

4.2.2 Procedury

U všech 37 dětí a dorostenců byla vyhodnocena následující data:

- Hladina homocysteinu v séru (S-Hcy)
- Ukazatel kostní formace: hladina alkalické fosfatázy (S-ALP) a hladina osteokalcinu v séru (S-OC)
- Ukazatel kostní resorpce: hladina CrossLaps v séru
- Sérová hladiny kalcia (S-Ca) a fosforu (S-P)
- Sérové hladiny kyseliny listové a vitamínu B₁₂
- Hladina cholesterolu v séru (S-cholesterol)
- Antropometrické parametry: tělesná výška, hmotnost a body mass index (BMI).
- Denzita kostního minerálu v bederní páteři (L1-L4 BMD)

Biochemické parametry byly vyšetřeny z jednorázového vzorku krve, který byl odebrán ráno nalačno.

4.2.3 Metodika

Tělesná výška byla měřena v den příslušného krevního odběru s přesností 0,5 cm na kalibrovaném stadiometru. Údaj o **tělesné hmotnosti** byl získán zvážením pacienta na kalibrované váze s přesností 0,5 kg.

Body mass index (BMI) byl vypočítán za užití rovnice:

$$\text{BMI} = \text{hmotnost (kg)} / \text{výška}^2 \text{ (m)}.$$

Denzita kostního minerálu (BMD) byla změřena na bederní páteři (obratle L1-L4) metodou rentgenové absorpciometrie o dvou energetických hladinách (dual-energy X-ray absorptiometry – DXA; přístroj Lunar GE) v den krevního odběru. Přesnost měření, vyjádřena jako variační koeficient, byla 1,0 %.

Hladina **homocysteinu** v séru byla měřena chemiluminescencí (Immulite 2500 immunoassay system, Siemens Healthcare Diagnostics, Německo) a vyjádřena v $\mu\text{mol/L}$. Chyba měření mezi jednotlivými soupravami (interassay variation) byla 2,06 % u vzorků s S-Hcy 7,43 $\mu\text{mol/L}$; 1,99 % u vzorků s S-Hcy 10,31 $\mu\text{mol/L}$, a 1,72 % u vzorků s S-Hcy 22,25 $\mu\text{mol/L}$.

Kalcémie a **fosfatémie** byly vyšetřeny kolorimetricky a hodnoty vyjádřeny v mmol/L .

Aktivita **alkalické fosfatázy** v séru byla měřena kolorimetricky a hodnoty vyjádřeny v $\mu\text{kat/L}$.

Hladina **CrossLaps** a **osteokalcinu** (S-OC) v krevním séru byly měřeny elektrochemiluminescencí (electrochemiluminescence immunoassay – ECLIA system, Elecsys-Cobas analyzátor) a vyjádřena v ng/L a ng/mL .

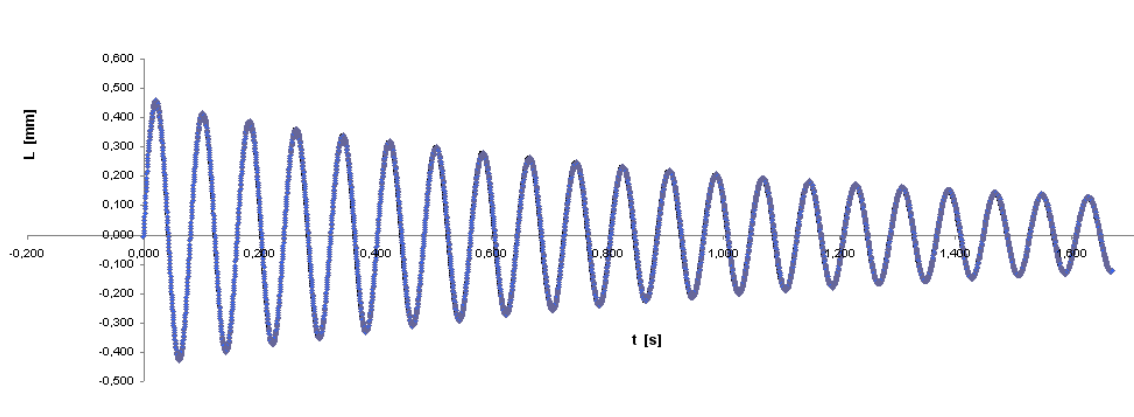
Sérové koncentrace **kyseliny listové** a **vitaminu B₁₂** (S-B₁₂) byly vyšetřeny chemiluminescencí (Access analyzátoru, Beckman Coulter) a vyjádřeny v $\mu\text{g/L}$ a ng/L .

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky experimentální části

5.1.1 Zpracování naměřených hodnot

Viskoelastické vlastnosti kostí byly změřeny metodou RMA. Vlastní kmity měly vždy charakter harmonických tlumených kmitů. To indikuje, že generalizovaný model (Obr. 19) obsahuje jen jednu významnou složku. Z těchto vlastních kmitů soustavy byly určeny komplexní tuhosti a následně vypočteny komplexní moduly vzorků.



Obr. 34: Harmonické tlumené kmity měřeného vzorku

Přístrojem se měří závislost průhybu (y) na síle (F). Pro lineární a linearizovatelné průběhy dostáváme harmonické tlumené kmity – odezvu na impuls (viz Obr. 34).

Průběh obsahuje složky odpovídající řešení následující rovnice:

$$F = M \frac{d^2 y}{dt^2} + N \frac{dy}{dt} + H y$$

Pro lineární systémy jsou parametry H a N nezávislé na frekvenci. U „po částech lineárních systémů“ se závislost na frekvenci projevuje. Frekvenční nezávislost může být kritériem lineárního či nelineárního chování těles⁶.

Program vyhodnotil z frekvence kmitů Hookeův koeficient (H) vypovídá o elastické složce chování tělesa a z tlumení kmitů vyhodnotil Newtonův koeficient (N), který charakterizuje viskozitu tělesa. Hmotnost setrvačného členu (M) je vždy dána (hmotnost sondy + závaží)⁶.

Pracuje se s frekvencemi, kde vliv setrvačnosti samotného vzorku je zanedbatelný. Samotný vzorek se tedy chová podle rovnice:

$$F = N \frac{dy}{dt} + H y$$

U lineárních systémů koeficienty N a H popisují plně jejich dynamické chování. Koeficienty jsou v tomto případě konstantní, nezávislé na frekvenci i na klidovém namáhání⁶.

Pokud jsou konstitutivní rovnice lineární jen po částech, jsou koeficienty N a H frekvenčně závislé a mohou záviset na klidovém namáhání.

Úplný popis musí zahrnovat frekvenční závislosti a závislosti na předpětí. V našem případě byla měření prováděna při stejném průhybu vzorku. Tíha vzorku byla kompenzována pružinou⁶.

Reálná část komplexní tuhosti:

$$S_{RE} = H$$

Reálná část komplexního modulu v normálovém namáhání (platnost vztahu je omezena na vzorky s velkým poměrem délky a příčných rozměrů):

$$E_{RE} = E = H \frac{4L^3}{ab^3}$$

Imaginární část komplexního modulu tuhosti:

$$S_{IM} = \omega N$$

Imaginární část komplexního modulu v normálovém namáhání⁶:

$$E_{IM} = N \frac{4L^3}{ab^3}$$

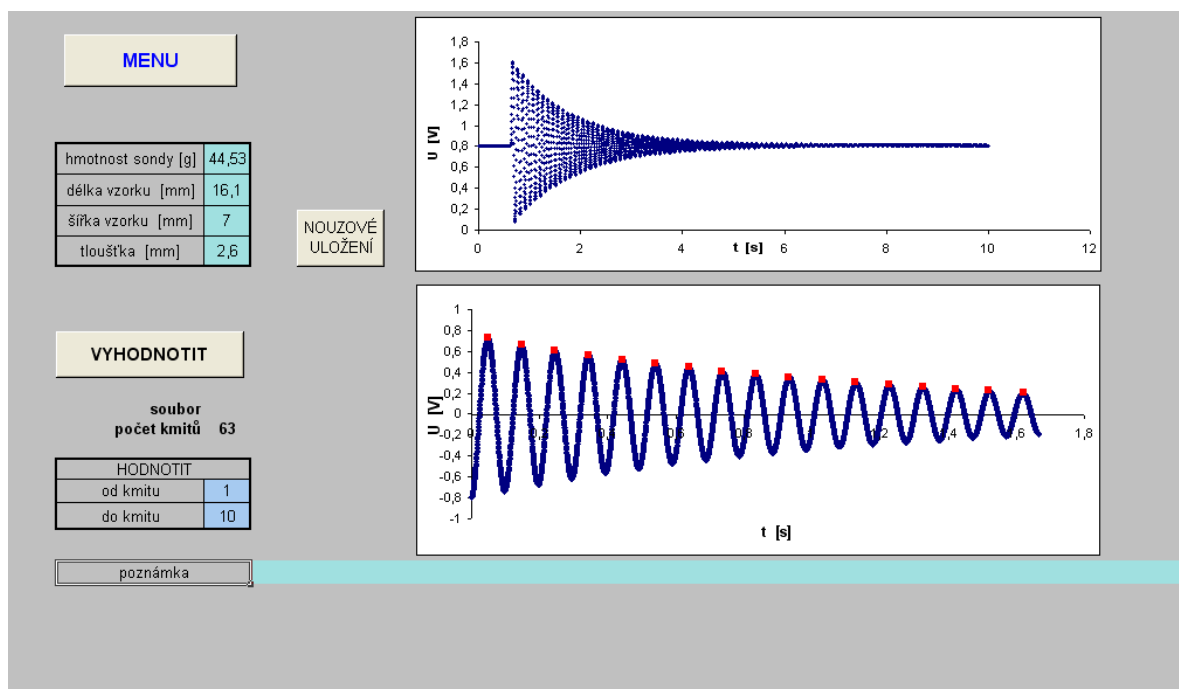
5.1.2 Výsledky 1. série měření

U všech 8 vzorků byly z frekvence kmitů pro každý den měření softwarem vypočítány Hookovy koeficienty, z hodnot tlumení amplitud Newtonovy koeficienty a dále viskozita η a dynamický modul pružnosti E_D . Výpočet byl proveden pro prvních 10 kmitů.

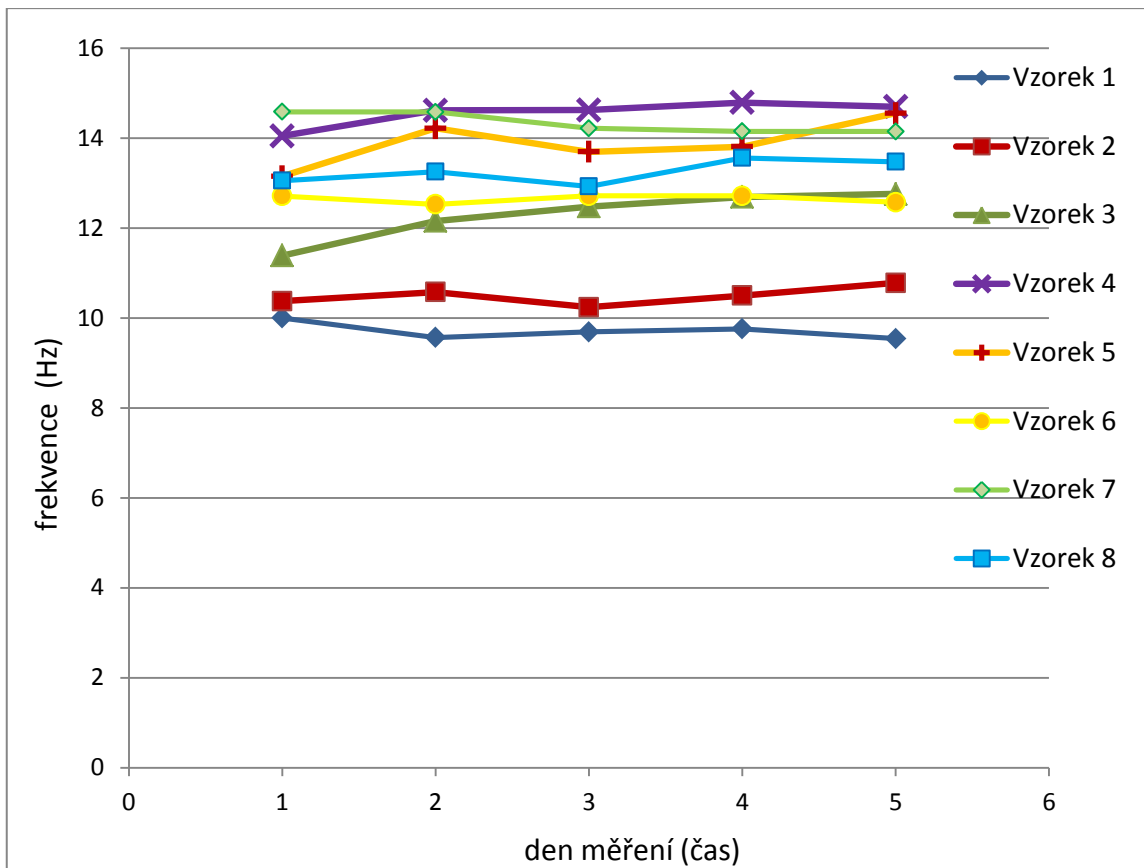
V Grafu 4 jsou vyneseny pro každý vzorek průměrné frekvence v závislosti na čase. V Grafu 5 jsou vyneseny průměrné hodnoty tlumení amplitud v závislosti na čase (dnech měření). Naměřené a vypočtené hodnoty jsou v příloze v Tabulce 11.

Z výsledků (Graf 4) vyplývá, že frekvence (a tedy i dynamické moduly) se v jednotlivých dnech měření téměř neměnily (ne více než o 1,5 Hz). Z toho lze vyvodit, že měření byla s vysokou pravděpodobností prováděna korektně a s relativně malými odchylkami při opakováních.

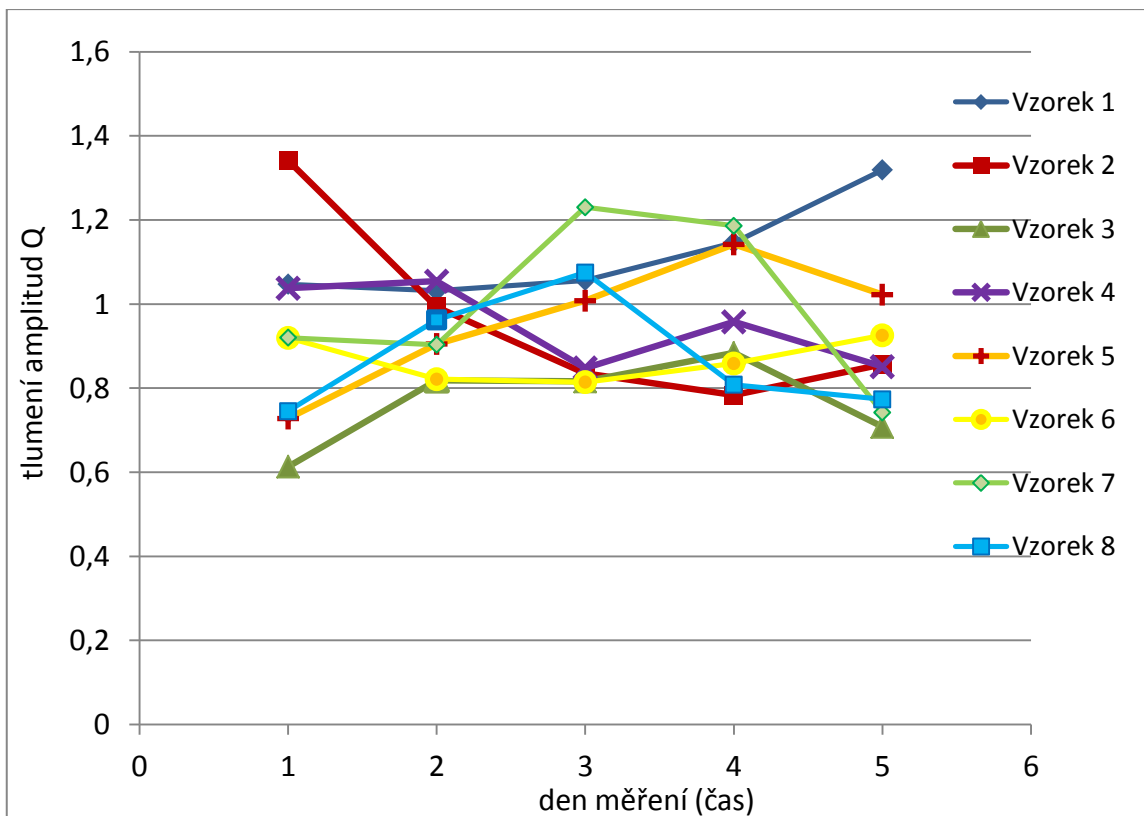
U vzorků se však měnila poměrně výrazně amplituda tlumení a tedy i viskozita (Graf 5), u vzorku č. 2 téměř o 40 %. Avšak změny viskozity s časem jsou u jednotlivých vzorků kostí zcela odlišné a nenaznačují žádnou tendenci. Zdůvodnění tohoto jevu je obtížné a spíše jej lze hledat v biologických odlišnostech vzorků. Měřené vzorky se z hlediska viskozity v průběhu skladování vzorků měnily, viskozitu nelze považovat za konstantní. I přesto však nebyla prokázána systematická změna viskoelastických vlastností kostí v průběhu prvních 15 dnů od porážky prasete.



Obr. 35: Vyhodnocení zaznamenaných hodnot softwarem na PC



Graf 4: Průměrné frekvence kmitání



Graf 5: Průměrná hodnota tlumení amplitud

5.1.3 Výsledky 2. série měření

Druhá série měření probíhala s 5 vzorky a opět byly z hodnot frekvence kmitů a tlumení vypočítány Hookeovy a Newtonovy koeficienty, viskozita η a komplexní modul pružnosti E_D . Výpočet byl proveden pro prvních 15 kmitů.

Do měřicí sestavy byla přidána kompenzační pružina, která kompenzovala hmotnost závaží. Pro každý vzorek se měření opakovala 5x při stejné hmotnosti závaží (setrvačného členu). Hmotnost závaží pro jednotlivá měření je uvedena v Tabulce 6. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou v příloze v Tabulce 12 a průměrné vypočítané hodnoty dynamického modulu a viskozity v Tabulce 7.

Pro výpočet je nutno brát v úvahu kompenzační pružinu, která se chová jako paralelní člen se setrvačným členem. Vyhodnocovací software použil pro výpočet zadanou tuhost pružiny (předpokládáme, že je po celé délce napnutí lineární). Změnou hmotnosti závaží se měnila frekvence harmonického kmitání vzorků.

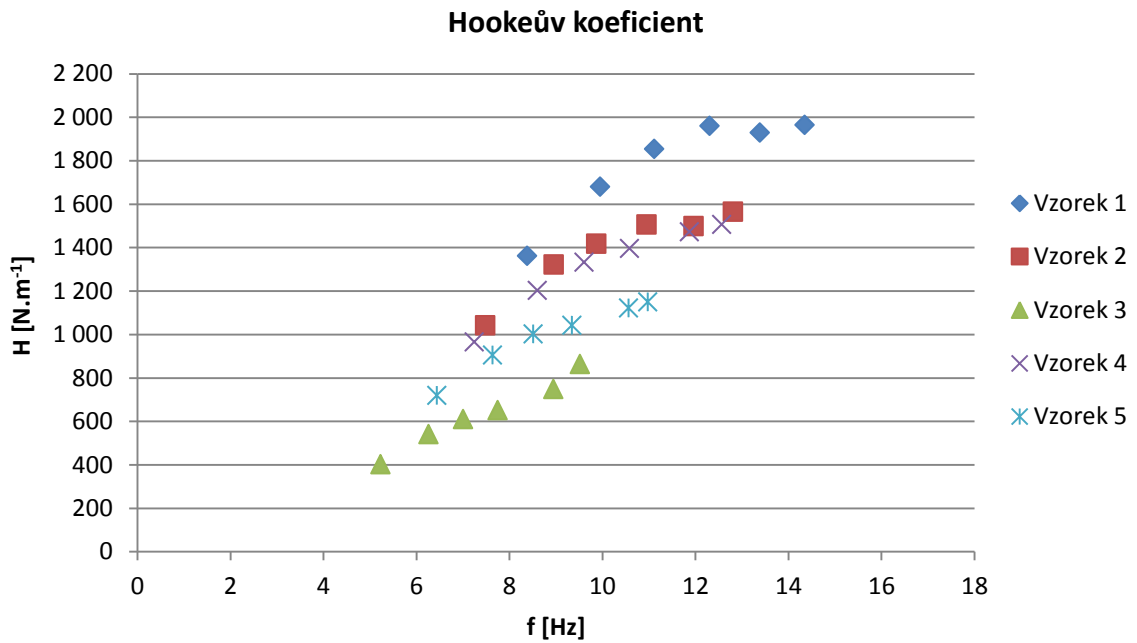
Cílem měření bylo získání viskoelastických vlastností měřených vzorků v závislosti na různých frekvencích (na rozdíl od 1. série, kde se získávala závislost modulů na čase).

V grafech jsou pro každý vzorek vyneseny dynamické moduly pružnosti a viskozity v závislosti na frekvenci. V dané konfiguraci se každé měření opakovalo 5x, proto jsou v grafech vyneseny jejich průměrné hodnoty.

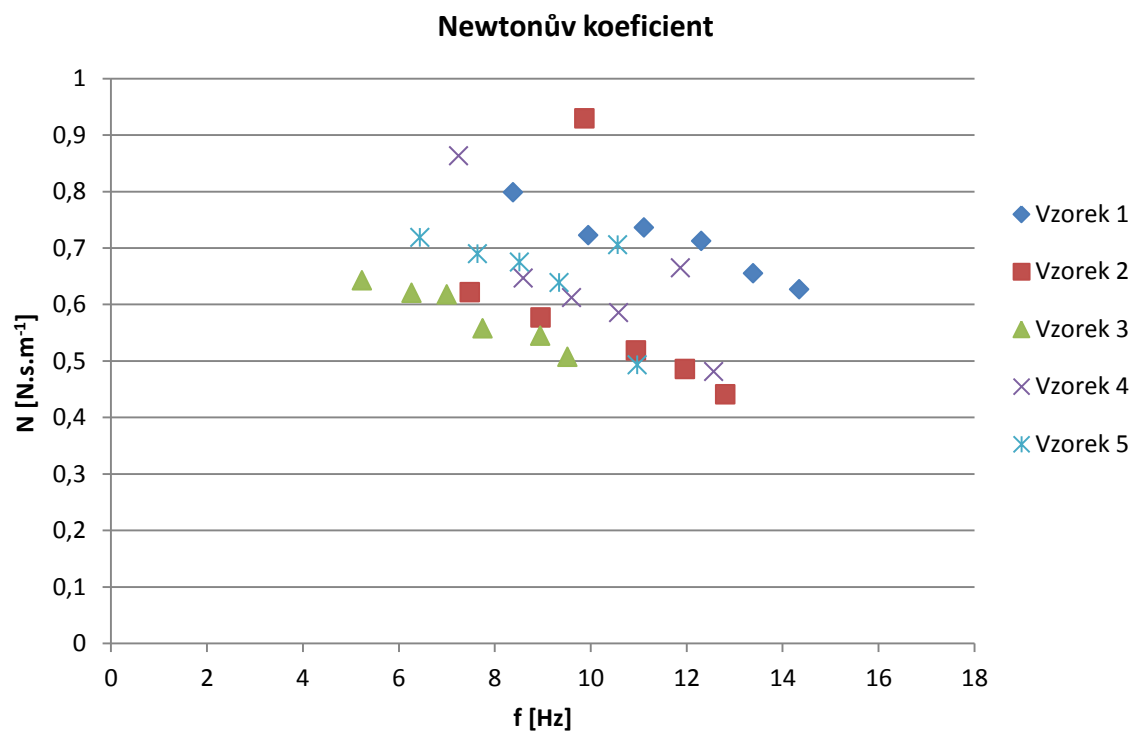
Ze získaných dat lze odpovědět na otázku, zda jsou viskoelastické vlastnosti vzorků kostí frekvenčně závislé. Výsledky v grafech naznačují, že měřené vzorky kostí jsou frekvenčně závislé a chovají se nelineárně (případně jen částečně lineárně). Takový výsledek odpovídá dosavadním zjištěním, že biologické materiály jsou téměř vždy nelineární.

Z výsledků vyplývá (Graf 6), že Hookeův koeficient a z něho odvozená reálná část modulu pružnosti jsou poměrně výrazně frekvenčně závislé (u všech vzorků rostoucí tendence). Také Newtonův koeficient a z něho odvozená viskozita η jsou dle Grafů 7 a 9 frekvenčně závislé (u všech vzorků je zřejmá klesající tendence). U vzorku č. 2 je vynesena do grafů hodnota mimo běžný rozsah ostatních hodnot (odlehlá hodnota), což pravděpodobně indikuje chybu měření a tato hodnota byla proto z hodnocení vyloučena.

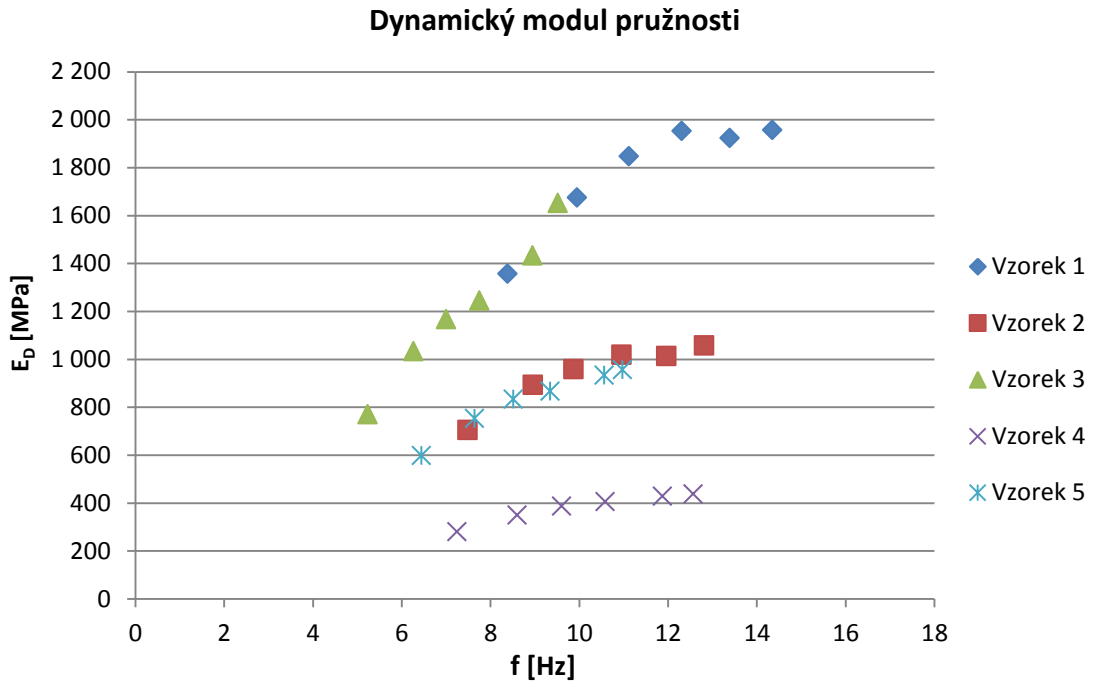
Výpočtem statistické spolehlivosti bylo ověřeno, že viskozita měřených vzorků 1, 2 a 3 klesá s frekvencí se spolehlivostí vyšší než 99 % (Tabulka 8).



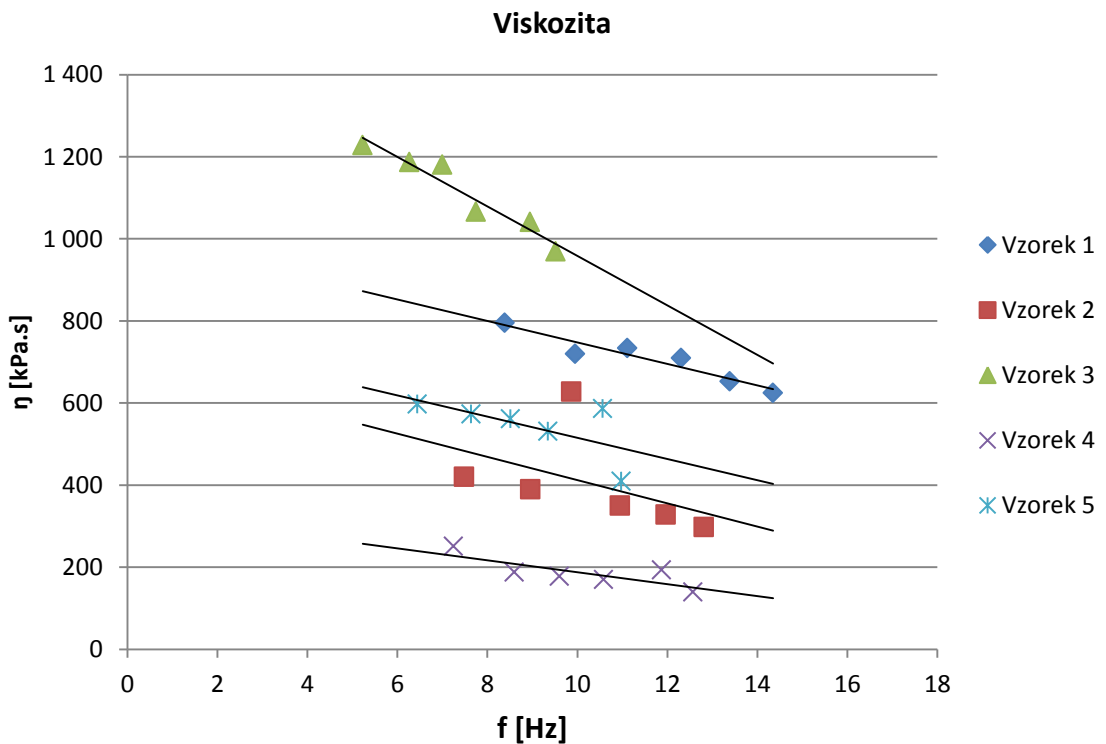
Graf 6: Průměrné hodnoty Hookeova koeficientu závislé na frekvenci



Graf 7: Průměrné hodnoty Newtonova koeficientu závislé na frekvenci



Graf 8: Průměrné hodnoty dynamického modulu pružnosti závislé na frekvenci



Graf 9: Průměrné hodnoty viskozity závislé na frekvenci (včetně tendence)

Vzorek	Konfigurace závaží	Frekvence	Dynamický modul	Viskozita	Časová konstanta
		f [Hz]	E _D [MPa]	η [Pa.s]	N/H [ms]
1	1	14,3	1957,21	624,76	0,59
	2	13,4	1922,97	652,92	0,43
	3	12,3	1952,97	709,78	0,40
	4	11,1	1847,54	733,78	0,36
	5	9,9	1674,77	720,14	0,34
	6	8,4	1356,38	795,90	0,32
2	1	12,8	1058,11	297,91	0,60
	2	12,0	1013,21	328,28	0,44
	3	10,9	1018,71	350,63	0,66
	4	9,9	958,63	628,17	0,34
	5	9,0	893,76	390,07	0,32
	6	7,5	704,36	420,07	0,28
3	1	9,5	1652,82	969,43	1,60
	2	8,9	1432,71	1041,07	1,15
	3	7,7	1244,71	1066,12	1,01
	4	7,0	1167,38	1180,96	0,86
	5	6,3	1034,17	1186,78	0,73
	6	5,2	770,22	1228,87	0,59
4	1	12,6	438,10	139,82	0,89
	2	11,9	428,25	193,23	0,54
	3	10,6	405,73	170,13	0,46
	4	9,6	387,26	177,84	0,42
	5	8,6	349,75	187,96	0,45
	6	7,2	280,51	250,87	0,32
5	1	11,0	955,66	409,87	1,00
	2	10,6	933,47	586,82	0,76
	3	9,3	866,57	531,27	0,67
	4	8,5	833,62	561,42	0,61
	5	7,6	753,21	573,57	0,63
	6	6,4	597,66	597,44	0,43

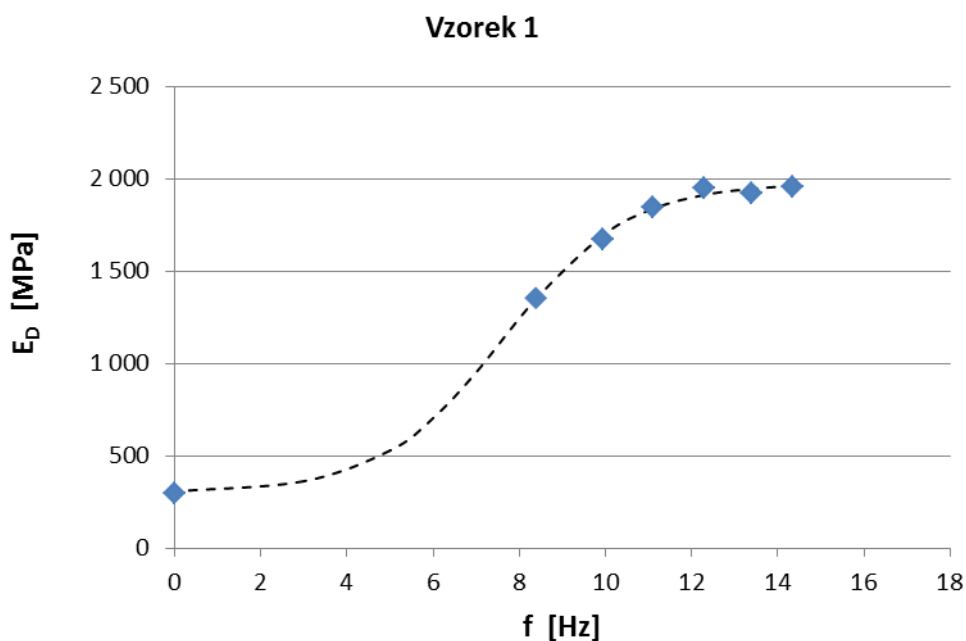
Tabulka 7: Průměrné vypočítané hodnoty 2. série měření

Vzorek	R2	R	p (statistická spolehlivost)
1	0,9065	0,952103	0,99
2	0,9895	0,994736	0,99
3	0,9313	0,965039	0,99
4	0,635	0,796869	Nevýznamné (menší než 0,95)
5	0,4168	0,6456	Nevýznamné (menší než 0,95)

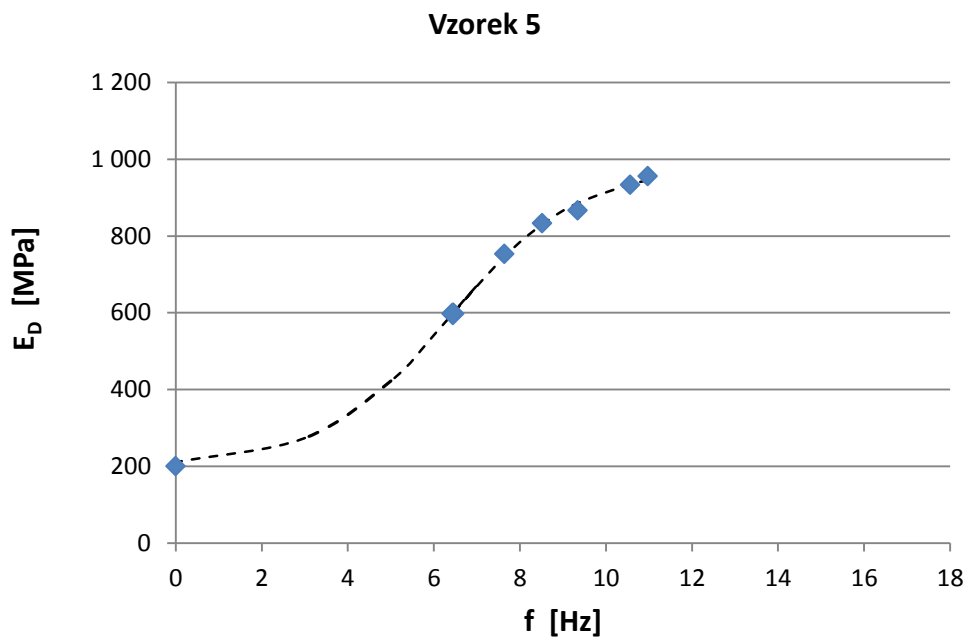
Tabulka 8 : Tabulka hodnot spolehlivosti

Statická tuhost měřených vzorků

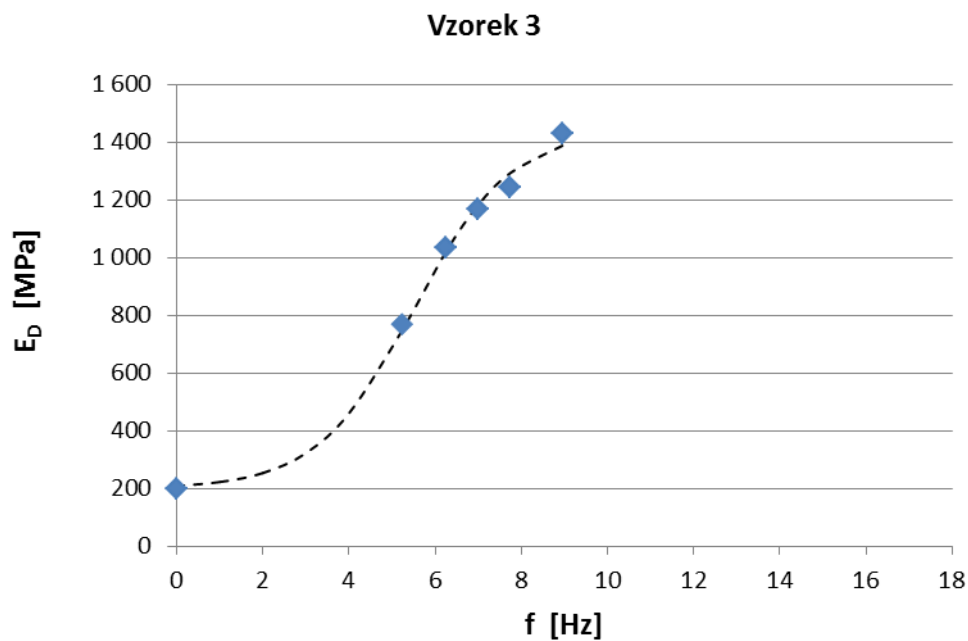
Pro korektní logistické vyhodnocení naměřených hodnot bylo nutné doplnit znalost statické tuhosti měřených vzorků (tuhost při nulové frekvenci). Znalost statické tuhosti umožní lépe ilustrovat průběh logistické funkce (křivky), a tak dokonaleji vyhodnotit naměřené závislosti. Hodnoty statické tuhosti vzorků byly naměřeny dodatečně až po matematickém vyhodnocení hodnot měření. Proto jsou v práci interpretovány jako orientační a v grafech jsou vyneseny přerušovanou čarou.



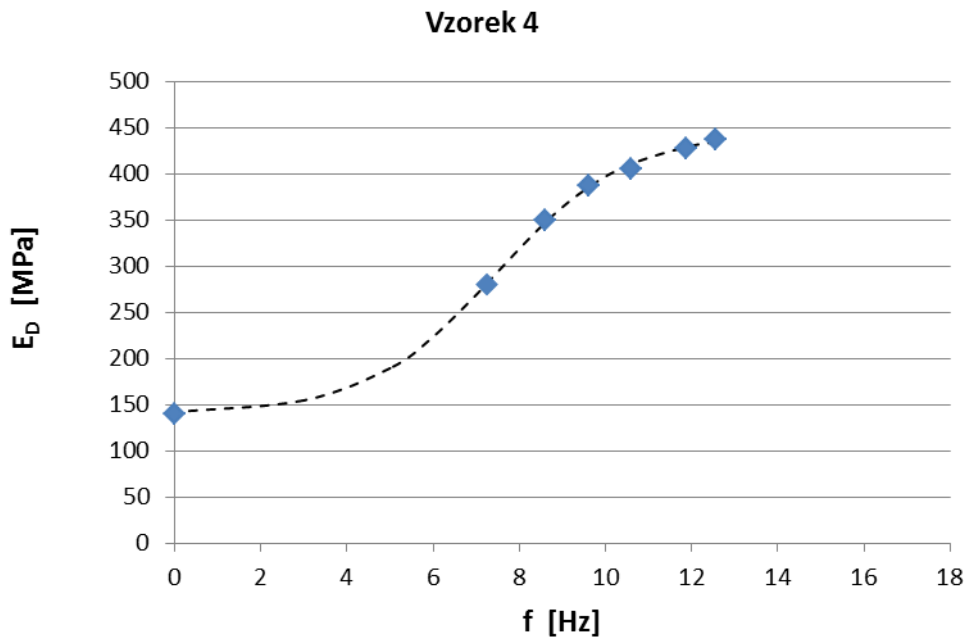
Graf 10: Dynamický modul pružnosti s vynesemím statické tuhosti pro vzorek 1



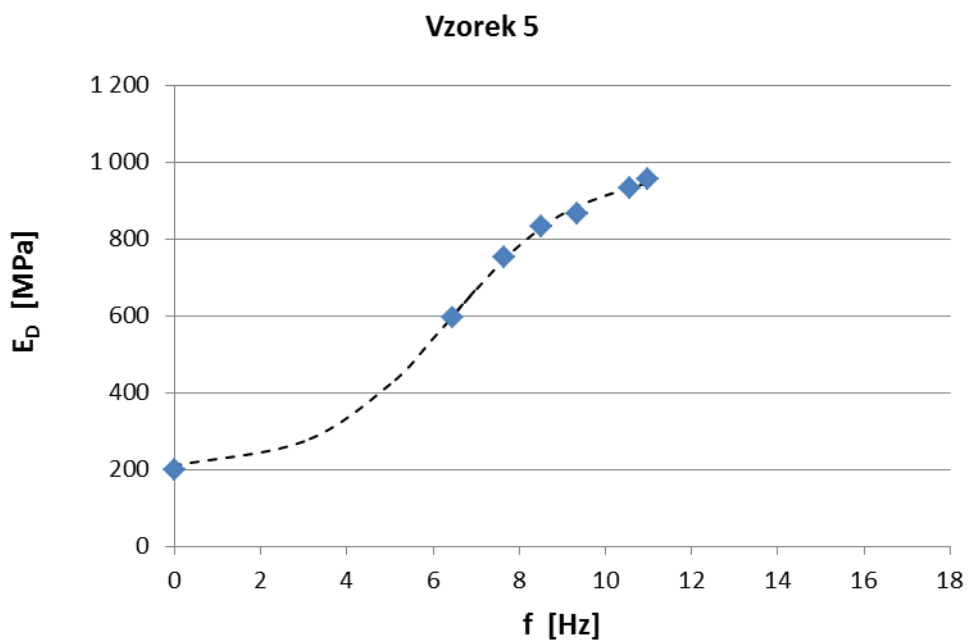
Graf 11: Dynamický modul pružnosti s vynesemím statické tuhosti pro vzorek 2



Graf 12: Dynamický modul pružnosti s vynesemím statické tuhosti pro vzorek 3



Graf 13: Dynamický modul pružnosti s vynesení statické tuhosti pro vzorek 4



Graf 14: Dynamický modul pružnosti s vynesení statické tuhosti pro vzorek 5

5.2 Výsledky klinické části

5.2.1 Pilotní studie

V pilotní studii byl hodnocen vztah homocysteinu a kostního zdraví u 19 dětí s opakovanými zlomeninami a nízkou denzitou kostního minerálu.

5.2.1.1 Statistické vyhodnocení

Hodnoty, které jsou závislé na věku dítěte (tělesná výška, S-Hcy, S-ALP, S-CTx) jsou vyjádřeny pomocí Z-skóre za použití vzorce:

$$\text{Z-skóre} = \frac{\text{aktuální získaná individuální hodnota} - \text{průměrná hodnota pro příslušný věk a pohlaví}}{\text{směrodatná odchylka pro věk a pohlaví}}$$

Referenční hodnoty pro L1-L4 BMD týkající se střeoevropské pediatrické populace jsou součástí pediatrického příslušenství (software) dodávaného výrobcem přístroje.

Jako referenční hodnoty byly použity též dříve publikované výsledky:

- Antropometrické parametry pro českou dětskou populaci z roku 2001⁵⁵
- S-Hcy u zdravých českých dětí⁵⁶
- S-ALP u zdravých českých dětí⁵⁷
- S-CTx u zdravých britských dětí - populace evropského původu⁵⁸

Ke statistickému hodnocení byly použity programy Sigmaplot 2.0 a Systat. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového t-testu a lineární regrese. Výsledky byly považovány za statisticky významné při hodnotě $p < 0,05$.

5.2.1.2 Výsledky pacientů

V pilotní studii byla hodnocena hladina homocysteinu v séru (S-Hcy) vzhledem k referenční populaci a vztah mezi S-Hcy a BMD a ukazateli kostního obratu (aktivita alkalické fosfatázy v séru – S-ALP, marker kostní formace; S-CrossLaps – marker kostní resorpce). Bylo zjištěno, že tito pacienti mají signifikantně vyšší hladinu homocysteinu v séru (S-Hcy) viz Tabulka 9. Dále byla nalezena vysoká inverzní a signifikantní korelace

mezi S-Hcy a BMD, ($r = -0,66$; $p = 0,01$) a S-Hcy a aktivitou alkalické fosfatázy v séru (S-ALP), ($r = -0,56$; $p = 0,03$). S-Hcy nesouvisel s počtem prevalentních zlomenin ($r = 0,11$) ani s hodnotami S-CrossLaps ($r = -0,14$).

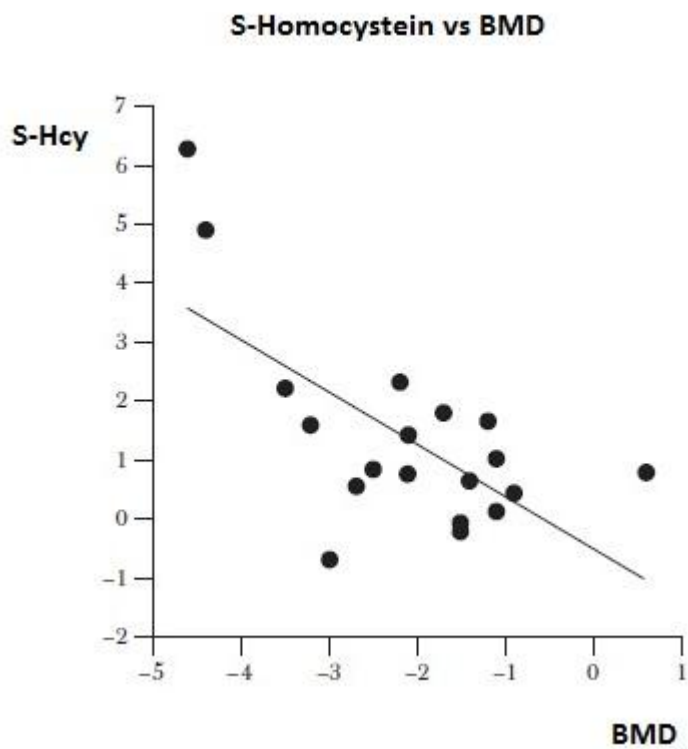
Parametr	Průměr	Směrodatná odchylka (SD)	Statistická spolehlivost (p) [†]
S-homocystein	1,4	1,8	0,001
L1-L4 BMD	-2,1	1,3	0,0001
S-ALP	0,03	1,0	0,91
S-CrossLaps	1,5	1,9	0,001
Tělesná výška	-0,06	1,0	0,27

[†] v porovnání s referenčními údaji

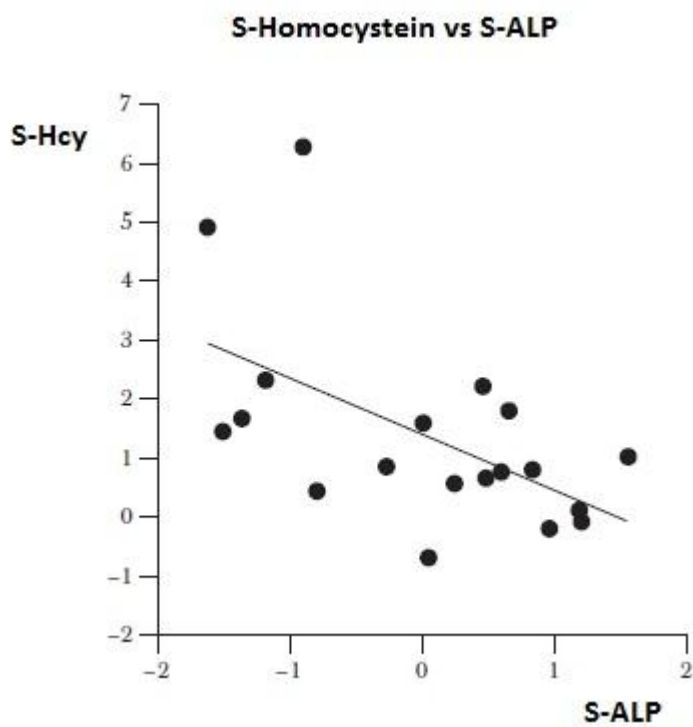
Tabulka 9: Získané hodnoty z pilotní studie (n=19), vyjádřeno jako Z-skóre ± SD

Průměrný výskyt prevalentních nízkozátěžových zlomenin byl $4,0 \pm 2,6$ SD na pacienta. Průměrná hodnota S-Hcy byla $10,9 \text{ mol/L} \pm 3,4$ SD. Průměrná hodnota L1-L4 BMD byla $0,818 \text{ g/cm}^2 \pm 0,138$ SD.

Průměrná hodnota S-ALP byla $3,6 \text{ } \mu\text{kat/L} \pm 2,1$ SD a průměrná hodnota S-CrossLaps byla $925 \text{ ng/L} \pm 522$ SD. Po přepočtu na Z-skóre a v porovnání s referenčními hodnotami, byly hodnoty S-Hcy Z-skóre signifikantně vyšší, zatímco výsledky L1-L4 BMD Z-skóre byly významně nižší. (Tabulka 9). Hodnoty S-ALP Z-skóre se významně nelišily od referenčních hodnot, zatímco hodnoty S-CrossLaps byly vyšší (Tabulka 9). Hodnoty S-Ca a S-P byly rovněž v normě: S-Ca $2,36 \pm 0,09 \text{ mmol/L}$ (rozmezí 2,18 – 2,54 mmol/L). S-P $1,52 \pm 0,19 \text{ mmol/L}$ (rozmezí 1,16 – 1,99 mmol/L). Průměrné hodnoty tělesné výšky vyjádřené jako Z-skóre, byly $-0,06 \pm 1,0$, významně se nelišily od referenčních hodnot (Tabulka 9). Dále nebyla nalezena korelace mezi tělesnou výškou a BMD Z-skórem ($r = -0,004$). Byla nalezena inverzní korelace mezi S-Hcy a L1-L4 BMD ($r = -0,66$; $p = 0,01$), (Graf 15) a S-Hcy a aktivitou alkalické fosfatázy v séru ($r = -0,56$; $p = 0,03$), (Graf 16). S-Hcy nesouvisel s počtem prevalentních zlomenin ($r = 0,11$) ani s hodnotami S-CrossLaps ($r = -0,14$).



Graf 15: Závislost S-Homocysteinu (Z-skóre) na BMD (Z-skóre)



Graf 16: Závislost S-Homocysteinu (Z-skóre) na S-ALP (Z-skóre)

5.2.2 Rozšířená studie

5.2.2.1 Statické vyhodnocení

Hodnoty, které jsou závislé na věku dítěte (tělesná výška, hmotnost, BMI, S-Hcy, S-ALP, S-OC, S-CrossLaps) jsme vyjádřili pomocí Z-skóre.

Referenční hodnoty pro L1-L4 BMD týkající se střeoevropské pediatriké populace jsou součástí pediatrikého příslušenství (software) dodávaného výrobcem přístroje.

Jako referenční hodnoty byly použity též dříve publikované výsledky:

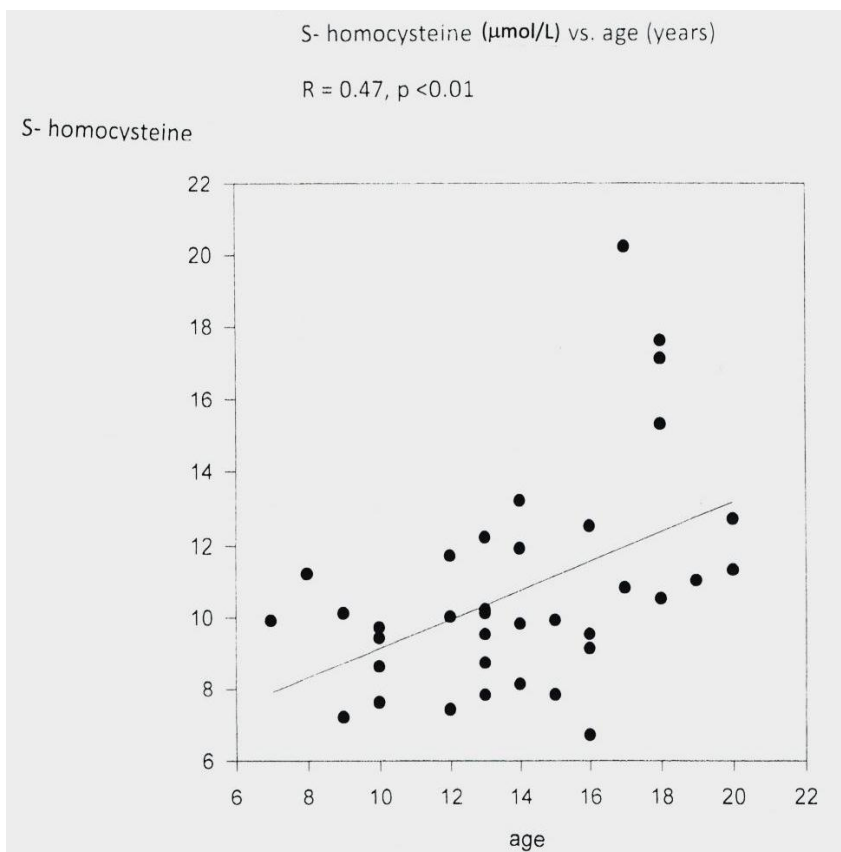
- Antropometrické parametry pro českou dětskou populaci z roku 2001⁵⁵
- S-Hcy u zdravých českých dětí⁵⁶
- S-ALP u zdravých českých dětí⁵⁷
- S-CTx u zdravých britských dětí - populace evropského původu⁵⁸

Normální rozmezí hodnot S-OC bylo stanoveno u 77 dětí a dorostenců ve věku 7 - 19 let, které netrpěly onemocněním skeletu, jater, ledvin, zažívacího traktu či endokrinních žláz.

Ke statistickému hodnocení byly použity programy Sigmaplot 2.0 a Systat. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového t-testu a lineární regrese. Výsledky byly považovány za statisticky významné při hodnotě $p < 0,05$.

5.2.2.2 Výsledky pacientů

Průměrný výskyt prevalentních nízkozátěžových zlomenin byl $3,3 \pm 2,3$ SD na pacienta. Průměrná hodnota S-Hcy byla $10,7 \mu\text{mol/L} \pm 2,9$ SD; rozmezí 6,7- 20 $\mu\text{mol/L}$. Byla zjištěna významnou pozitivní korelaci mezi S-Hcy a věkem ($r = 0,47$; $p < 0,01$), (Graf 16).



Graf 16: Závislost S-Homocysteinu (Z-skóre) na věku pacientů

7 pacientů (19%) mělo hladiny S-Hcy nad + 2 SD, 30 pacientů (81%) mělo S-Hcy v rozmezí ± 2 SD.

Po přepočtu na Z-skóre a v porovnání s referenčními hodnotami byly hodnoty S-Hcy signifikantně vyšší, zatímco výsledky L1-L4 BMD Z-skóre byly významně nižší. Hodnoty S-ALP se významně nelišily od referenčních hodnot, zatímco S-CrossLaps a S-OC byly vyšší (Tabulka 10).

Průměrné hodnoty sérových hladin kyseliny listové a vitamínu B₁₂ byly v rozmezí normálních hodnot: Kyselina listová $7,5 \mu\text{g/L} \pm 4,2$ SD (normální hodnoty 2,3 – 17 $\mu\text{g/L}$). Vitamin B₁₂ $413 \text{ ng/L} \pm 143$ SD (normální hodnoty 180 – 914 ng/L).

Hodnoty S-Ca a S-P byly rovněž v normě: S-Ca $2,33 \pm 0,10$ mmol/L (rozmezí 2,13 – 2,54 mmol/L). S-P $1,45 \pm 0,23$ mmol/L (rozmezí 0,78 – 1,99 mmol/L). Průměrná hodnota S-cholesterolu byla $4,21 \pm 0,96$ mmol/L (rozmezí 3,06 – 5,59 mmol/L), tudíž v rozmezí fyziologických hodnot 2,7 -5,6 mmol/L.

Průměrné hodnoty tělesné výšky, hmotnosti a BMI vyjádřené jako Z –skóre se významně nelišily od referenčních hodnot (Tabulka 10), ale u pěti subjektů přesáhly

hodnoty BMI Z-skóre + 2 SD. Tělesná výška, hmotnost a BMI vyjádřeny jako Z-skóre pozitivně korelovaly s L1-L4 BMD Z-skóre ($r = 0,44, 0,53$ a $0,50$; $p = 0,02$).

Parametr	Průměr	Směrodatná odchylka (SD)	Statistická spolehlivost (p) [†]
S-homocystein	1,31	1,49	< 0,0001
L1-L4 BMD	-1,74	1,32	< 0,0001
S-ALP	0,02	1,01	0,88
S-CrossLaps	1,21	1,79	0,0001
S-osteokalcin	0,38	0,53	0,001
Tělesná výška	-0,05	1,31	0,82
Hmotnost	0,18	1,62	0,50
BMI	0,48	1,88	0,12

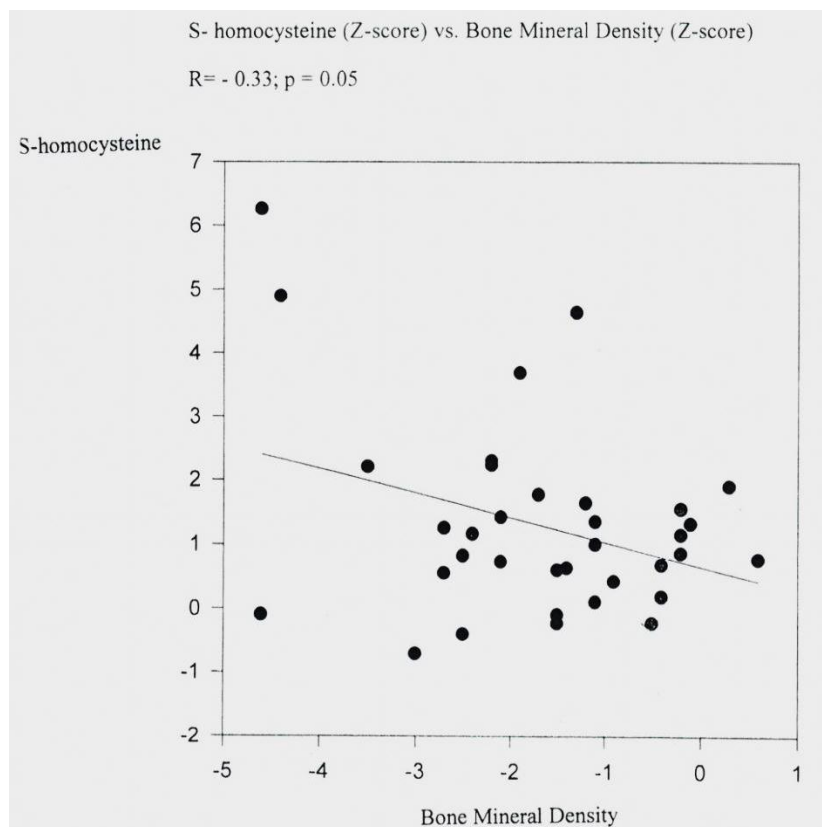
[†] v porovnání s referenčními údaji

Tabulka 10: Získané výsledky z rozšířené studie (n=37); vyjádřeno jako Z-skóre ± SD

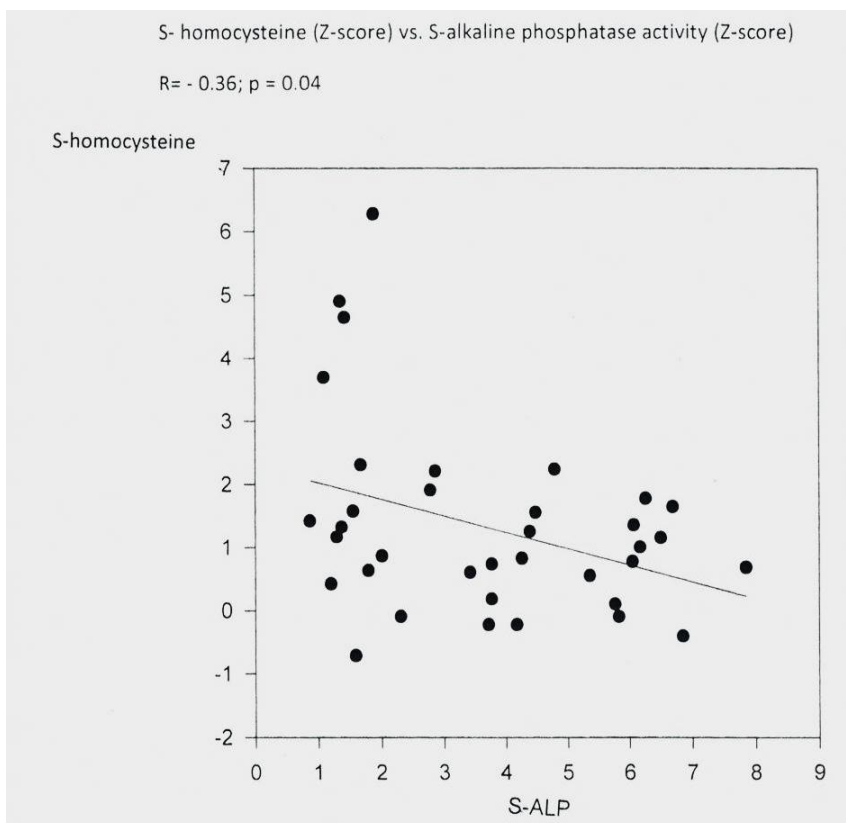
Hodnoty S-Hcy inverzně korelovaly s L1-L4 BMD (Graf 17) a S-ALP (Graf 18), ale nekorelovaly s počtem prevalentních fraktur, hodnotami S-OC ($r = 0,11$) či S-CrossLaps ($r = 0,003$).

Byla zjištěna významnou inverzní korelace mezi S-Hcy a vitamínem B12 ($r = -0,36, p = 0,05$). S-Hcy nekoreloval s hladinou kyseliny listové ($r = 0,05$)

Byla zjištěna též pozitivní korelace mezi S-OC a S-CTx ($r = 0,36, p = 0,05$), S-ALP a S-OC ($r = 0,58, p = 0,01$), a S-CTx a S-ALP ($r = 0,39, p = 0,05$).



Graf 17: Závislost S-Homocysteinu (Z-skóre) na BMD (Z-skóre)



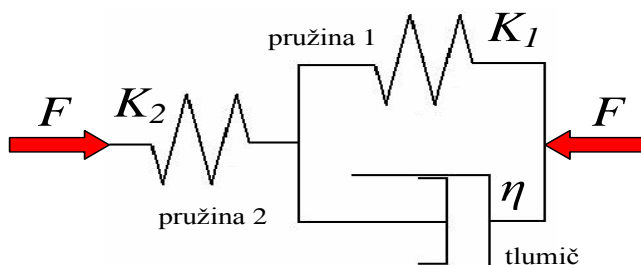
Graf 18: Závislost S-Homocysteinu (Z-skóre) na S-ALP (Z-skóre)

6 DISKUZE

6.1 Experimentální část

Jedním z dílčích cílů práce bylo ověření rezonanční metody a aplikovatelnosti RMA přístrojů v praxi a potvrzení správnosti jejich vývoje. V experimentální části disertační práce byly používány a ověřovány dvě varianty přístrojů. První varianta (Obr. 30 a Obr. 31), druhá varianta (Obr. 32 a Obr. 33).

První varianta přístrojů byla jednodušší a vycházela z všeobecně přijímaného předpokladu, že mechanické chování kostí lze popsat vhodným reologickým modelem²³.



Obr. 36: Příklad reologického modelu kosti

Matematický popis dynamického chování reologických modelů složených z Hookeových, Newtonových a setrvačných těles je korektnějším způsobem popisu, než klasické reologické modely. Tento popis vede k lineární diferenciální rovnici typu

$$a_0 y + \sum_{l=1}^n a_l y^{(l)} = b_0 x + \sum_{m=1}^m b_m x^{(m)},$$

kde a a b jsou konstantní koeficienty, l a m jsou stupně derivace, x je vstupní veličina (síla či mechanické napětí), y je výstupní veličina (absolutní či relativní deformace)⁶.

Všechny koeficienty v této rovnici jsou konstantní. Neboli musí být nezávislé na velikosti ustálených hodnot i na všech derivacích proměnných. Koeficienty musí být proto nezávislé na frekvenci deformace a lineární musí být i strain-stress charakteristika. Koeficienty musí být konstantní pro celý rozsah deformací a frekvencí, který padá prakticky v úvahu⁶.

Naše předběžná měření i předchozí výsledky měření na katedře vedla k pochybnostem o oprávněnosti tohoto předpokladu. Proto byla použita poněkud komplikovanější konstrukce (2. série měření), vhodná pro počáteční lineární systémy.

Místo použití reologických modelů byly určovány komplexní moduly a komplexní tuhosti, jako univerzálnější prostředek popisu mechanického chování mechanických systémů.

Cílem první série měření bylo potvrdit či vyvrátit závislost viskoelastických vlastností kostí na době uchování, tzn. proměnlivost/změnu dynamického modulu pružnosti a viskozity *post mortem* ve zvoleném časovém intervalu. Z výsledků měření vyplynulo, že frekvence harmonického kmitání vzorků se v čase příliš neměnila, zato viskozita ano. Z naměřených hodnot ovšem nevyplynula žádná výrazná tendence, proto nelze prokázat změnu viskoelastických vlastností měřených vzorků během prvních 15 dnů *post mortem*. První měření dále posloužilo pro verifikaci RMA přístroje a seznámení se se samotnou metodikou měření, proto ho lze nazvat ověřovacím.

V druhé sérii měření jsem se zabývala závislostí Hookeova a Newtonova koeficientu, z toho vyplývajících dynamických modulů pružnosti a viskozity na frekvenci. Měření probíhalo při frekvencích v rozsahu cca 5 až 15 Hz. Změna frekvence se prováděla změnou hmotnosti setrvačného členu (záváží), který byl kompenzován pružinou. Z analýzy výsledků druhé série vyplynulo, že je nutné dodatečně zjistit hodnotu statické tuhosti. Tato hodnota umožňuje vynést s vyšší přesností a vypovídající hodnotou křivku závislosti dynamického modulu pružnosti na frekvenci. Hodnoty statické tuhosti jsou ovšem v této práci považovány jen za orientační, protože byly měřeny s časovým odstupem.

Z výsledků vyplývá, že měřené vzorky kostí mají elastický koeficient (E) i viskózní koeficient (η) prokazatelně frekvenčně závislé. Z tohoto závěru lze konstatovat, že viskoelastické vlastnosti měřených kostí jsou z biomechanického hlediska nelineární (případně lineární jen po částech). Obecné řešení nelineárních vlastností materiálů je nerealistické, proto je z fyzikálního hlediska běžné považovat je za lineární nebo spíše lineární po částech, což umožňuje aplikovat na ně fyzikální a matematické modely.

Dalším z dílčích cílů bylo ověření funkčnosti a aplikovatelnosti přístrojů. Dospěli jsme k závěru, že dobrá opakovatelnost měření pomocí druhé série potvrzuje aplikovatelnost. Měření jsou rychlá a nenáročná na obsluhu, což je důležitý předpoklad úspěšného provedení měření. Naše práce, jak se domníváme, přispěla i ke zdokonalování konstrukce přístrojů, neboť vzhledem k relativně málo rozšířené metodě nejsou přístroje zcela připravené a odladěné tak, aby vyhovovaly podmínkám při laboratorním testování. Každým provedeným měřením se přístroje zdokonalují na základě zjištěných nedostatků.

Pro budoucí dokonalejší měření by bylo například vhodné dořešit jednodušší a přesnější způsob upnutí vzorků, aby byla měření opakovatelná s vyšší přesností.

Odolnost viskoelastických materiálů (kostí) proti porušení je nutné z biomechanického hlediska hodnotit nejen velikostí působící síly, ale také délkou trvání (časem) působení. Doba trvání impulsu má vliv na odolnost proti porušení (např. zlomu kosti). Obecně platí, že čím kratší impuls, tím větší je odolnost materiálu proti trvalému poškození.

Lopot²³ ve své literatuře uvádí, že v případě rychlých zatížení, která se vyskytují např. při pádech nebo při nárazech na tuhé pevné překážky, dochází k „zablokování“ tlumiče a veškerá deformace se odehrává na pružině 2 (Obr. 36), která reprezentuje ty nejužší kostní komponenty. Vysoká tuhost znamená vznik velkých napětí již při malých deformacích a tedy zvýšené riziko poškození, resp. zlomeniny. Kost má vzhledem ke své konstrukci pochopitelně značně anizotropní charakter a vlastnosti modelu se budou markantně lišit i podle směru zatížení. K vyčerpání mechanických vlastností kosti, a tedy ke zlomenině, je proto zapotřebí různě velkých sil v závislosti na směru jejich působení.

Dalším z parametrů, vypovídajícím o pevnosti materiálů, je časová konstanta, což je podíl Newtonova a Hookova koeficientu. Tato konstanta udává rychlost návratu materiálu po deformaci do původního stavu⁶. Časová konstanta měřených vzorků kostí byla v našem případě v rozmezí 0,28 – 1,60 ms. U námi měřených vzorků lze očekávat, že kosti by lépe odolaly úderům kratším než je vypočtená časová konstanta.

6.2 Klinická část

Klinická část disertační práce se dělila na pilotní a rozšířenou studii. Z pilotní studie 19 dětí s prevalentními zlomeninami a nízkou kostní densitou (BMD) byly získány výsledky, které svědčily pro negativní vliv zvýšené S-Hcy na kostní formaci a BMD, zatímco kostní resorpce byla u těchto pacientů zvýšena. Nízká kostní denzita dětí nebyla ovlivněna tělesnou výškou, protože tělesná výška se nelišila od referenčních hodnot a nevyplývala žádná korelace mezi kostní densitou a tělesnou výškou.

V pilotní studii nebyla prokázána souvislost mezi počtem prevalentních zlomenin a S-Hcy. Můžeme navrhnout hypotézu, že studie nebyla dostatečně obsáhlá na to, aby detekovala významný vztah mezi dvěma sledovanými parametry. K případnému prokázání byla proto studie následně rozšířena.

V rozšířené studii 37 dětí s prevalentními zlomeninami a nízkou kostní denzitou byly získány velmi podobné výsledky: Zvýšenou hladinu S-Hcy a jeho inverzní korelaci s S-ALP a L1-L4 BMD. Vzhledem k nálezům vyšších hodnot S-OC a S-CrossLaps můžeme usuzovat na zvýšený kostní obrát. Pro to svědčí též vzájemné korelace mezi jednotlivými ukazateli kostního obrátu. Nízké hodnoty BMD u našich pacientů nebyly ovlivněny malým věkem, neboť tělesná výška byla u těchto dětí v normě. Korelace výšky, hmotnosti a BMI s denzitními (BMD) výsledky potvrzují vliv antropometrických parametrů na BMD. Vzhledem k tomu, že u dětí již byla prokázána jasná souvislost mezi nízkou BMD a výskytem fraktur^{59,60}, hyperhomocysteinémie může znamenat významný rizikový faktor pro kostní zdraví u dětské populace. U dospělých byla již opakovaně prokázána souvislost mezi vysokými hodnotami S-Hcy a nízkou BMD^{47,52}. Byly rovněž dokumentovány vysoké hodnoty S-Hcy u osteoporotických postmenopauzálních žen bez vztahu k hodnotám BMD⁴⁸. Byla též prokázána souvislost mezi vysokými hladinami S-Hcy zvýšeným rizikem zlomeniny kyčle u seniorské populace⁵¹.

Z hlediska patofyziologického je vztah osteoporózy u pacientů s vysokým S-Hcy vysvětlován akumulací homocysteinu v kosti, což vede k úbytku trámčité kostní tkáně a zhoršení mechanické odolnosti skeletu⁵⁰. Homocystein též stimuluje osteoklastickou aktivitu⁶¹. Svůj podíl může též mít snížená metylační kapacita kosti⁶².

U námi sledovaných pediatrických pacientů nebyla nalezena souvislost mezi počtem prevalentních zlomenin a hladinou S-Hcy. Pravděpodobně by byl prokázán v případě několikanásobně vyššího počtu vyšetřovaných subjektů, neboť nízké hodnoty BMD snižují odolnost (pevnost) kostí proti namáhání (tedy zvyšují pravděpodobnost fraktury). Ohledně kardiovaskulárního rizika: sérová hladina cholesterolu a BMI nebyly úhrnně signifikantně zvýšeny, pouze jeden pacient byl hypertonik.

7 ZÁVĚR

Tato disertační práce v experimentální části navazuje na rozsáhlejší experiment prováděný katedrou biofyziky Farmaceutické fakulty UK HK. Projekt je zaměřený na určování mechanických vlastností jak biologických materiálů, tak materiálů umělých (používaných v chirurgii) a vyvinutí vhodných přístrojů pro měření viskoelastických vlastností.

V teoretické části je podrobně uveden popis anatomie a fyziologie lidských kostí, jejich vývoj, metabolismus, některá metabolická onemocnění kostí, vliv stravy na jejich kvalitu a vliv homocysteinu na kostní zdraví. V experimentální části práce jsem se zabývala ověřením rezonanční metody při měření viskoelastických vlastností kostí. Vzorky byly získány preparováním pravé hrudní končetiny (os metacarpale quartum) prasete domácího. V klinické části práce jsem hodnotila vliv vyšších hladin homocysteinu na kostní zdraví (denzitu kostí) u dětí a dospívajících.

V současné době je obvyklé pro měření viskoelastických vlastností materiálů používat přístroje DMA, které využívají přímého měření frekvenčních charakteristik. Určování komplexních modulů a komplexních tuhostí na základě přístrojů DMA je z technických důvodů nepřesné a drahé. Praktičtější je použít k určování modulů a tuhostí rezonanční metodu, kde dosáhneme vyšší citlivosti, lepší přesnosti a přístroje jsou levnější. Jedním z cílů proto bylo provést pilotní měření na vzorcích kostí s užitím nového přístroje RMA a tím ověřit potvrzení správnosti jeho vývoje, aby se v praxi mohl využít např. k pochopení dynamické pevnosti kostí a kostních náhrad. Byly provedeny 2 experimentální série měření, pro které byly použity 2 různé varianty přístrojů RMA.

Z naměřených a vypočtených hodnot 1. série lze odečíst, že doba uskladnění měřených vzorků v průběhu prvních 15 dnů nemá výrazný vliv na biomechanické vlastnosti. Frekvence vzorků byla po 15 dnech téměř konstatní, tlumení amplitud nevykázalo žádnou tendenci (bylo spíše nahodilé). Nebyla tedy prokázána, avšak ani vyloučena, systematická změna viskoelastických vlastností. Proto pro další případná měření vzorků kostí zůstává obecným doporučením pro korektnost a interpretaci výsledků, provádět je buď in vivo (obvykle nelze), nebo post mortem, avšak co nejdříve od vyjmutí vzorku (např. během 2 až 3 dnů) a s dodržením podmínek skladování (v lednici a v roztoku).

Zkušební z 1. série měření posloužily také pro určité úpravy a vylepšení měřicí sestavy pro 2. sérii měření. Byla přidána možnost vložit různá závaží s kompenzační pružinou a tím měnit frekvenci kmitání vzorků. Bylo tím umožněno ověřit chování vzorků v širším frekvenčním (dynamickém) poli, tedy blíže reálným podmínkám namáhání kostí. Dodatečně byly zjištěny hodnoty statické tuhosti (při statickém zatížení), které umožňují vynést s vyšší přesností a vypovídající hodnotou křivku závislosti dynamického modulu pružnosti na frekvenci. Z tohoto zjištění vyplývá ponaučení pro případná budoucí měření: změřit statickou tuhost jednotlivých vzorků kostí neprodleně s ostatními parametry.

Z výsledků měření vyplynula prokazatelná frekvenční závislost elastického (E_D) i viskózního (η) koeficientu. Z toho lze vyhodnotit závěr, že viskoelastické vlastnosti měřených kostí jsou z biomechanického hlediska nelineární (případně lineární jen po částech).

Výsledky a ověřený postup poskytují metodiku pro řešení mechanického přizpůsobení kostí a umělých struktur. V budoucnosti by mohly být využitelné i k diagnostickým účelům a pro hodnocení výsledků terapie. Z měření lze relativně levně a jednoduše získat časovou konstantu materiálu, která má výrazný vliv na odolnost materiálu proti porušení. Tento parametr tak může pomoci např. v medicíně k posouzení rizika poškození (zlomení). V současnosti jsou požadovány zvýšené nároky na viskoelastické vlastnosti náhrad, neboť je nutné sladit biomechanické vlastnosti s fyziologickými vlastnostmi biologických struktur, neboli zajistit vzájemnou kompatibilitu. Cílem je tedy vyrábět náhrady tak, aby se v mechanických parametrech (např. v pevnosti, v pružnosti, v roztažnosti) co nejvíce podobaly lidským strukturám. Předpokládáme, že nová metoda RMA by mohla v budoucnosti přispět k výzkumu pro lepší a přesnější poznání viskoelastických vlastností materiálů používaných v medicíně.

V klinické části byly provedeny dvě studie, v první pilotní byly hodnoceny záznamy 19 pacientů, v druhé rozšířené studii bylo hodnoceno 37 pacientů. Cílem bylo prokázat nebo vyvrátit vztah mezi vysokou hladinou homocysteinu v séru a nízkou denzitou kostního minerálu u dětí a dospívajících.

Tato závislost již byla prokázána u postmenopauzálních žen. U dětí a dorostenců dosud neexistují souvislé údaje o vztahu hladiny homocysteinu v séru (S-Hcy) a stavem skeletu. Z laboratorních výsledků krevního séra byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou alkalické fosfatázy a hladinou osteokalcinu, dále mezi hladinou alkalické

fosfatázy a hladinou CrossLaps a korelace mezi hladinou osteokalcinu a hladinou CrossLaps. Tyto výsledky prokazují zvýšený kostní obrat a negativní vliv vyšších hodnot S-Hcy na kostní denzitu u dětí. Osteoporóza a zvýšené riziko zlomenin u pacientů s vysokou hladinou S-Hcy je v současnosti vysvětlováno hromaděním homocysteinu v kosti, což vede k výraznému úbytku trámčité kosti a tím k poklesu pevnosti kostí⁶¹.

Z výsledků klinické části vyplynulo, že vyšší hodnoty sérového homocysteinu představují rizikový faktor pro kostní zdraví nejenom u postmenopauzálních žen, ale též v dětském a dorostovém věku. Osteoporóza je nejčastější metabolické onemocnění skeletu a postihuje 7–8 % obyvatel, osteoporotická zlomenina hrozí každé 3. ženě a každému 6. muži ve věku nad 50 let, až 20 % pacientů na následky osteoporotických zlomenin umírá a 30 % se stává nesoběstačnými⁶⁸. Proto by bylo vhodné, zaměřit budoucí výzkum nejen na homocystein, ale i další faktory, které mohou jak negativně tak i pozitivně ovlivnit biomechanické vlastnosti kostí.

Jsme si vědomi faktu, že jsme u pediatrických pacientů nenalezli vztah mezi počtem prevalentních zlomenin a S-Hcy, ale počet vyšetřovaných subjektů toto nejspíše neumožnil. K nalezení prokazatelného vztahu mezi S-Hcy a počtem fraktur by bylo třeba vyšetřit několik stovek pacientů. Výsledky nicméně potvrzují negativní vliv zvýšených hodnot S-Hcy na kostní zdraví již u pediatrické populace. Vývojovým aspektům řady chorob postihujících geriatrickou populaci (např. osteoporóza, hypertenze, hypercholesterolemie, obezita) je v současné době věnována zasloužená pozornost, neboť řada těchto chorobných stavů má svůj základ již v dětském věku. Je pravděpodobné, že sem patří též vliv hyperhomocysteinémie na kostní tkáň.

8 SEZNAM LITERATURY

1. Blahoš, J: *Osteoporóza: diagnostika a terapie v praxi*. První vydání. Praha: Galén, 1995. s. 31
2. Brabcová, M: *Výživa člověka jako součást prevence osteoporózy a osteomalacie*. Bakalářská práce. [online]. 2011, [cit. 2013-01-20].]. Dostupný z WWW: <http://theses.cz/id/dkgenx/bakalsk_prce.pdf >.
3. Broulík, P.: *Osteoporóza: osteoporóza, osteomalacie, osteodystrofie*. První vydání. Praha: Maxdorf, 1999. s. 13-14.
4. Broulík, P.: *Poruchy kalciofosfátového metabolismu*. První vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. 192 s.
5. Delter: *Viskoelasticita*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://delter.netsite.cz/viskoelasticita>>.
6. Ďoubal, S. a kol.: *Mechanické chování viskoelastických těles*. První vydání. Praha: Karolinum, 2012. 124 s.
7. Doubek, J.: *Fyziologie* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://pandora.idnes.cz/part/2012/5/5886/3/F-Kost.pdf> >.
8. Encyclopaedia Britannica: *Hooke's law*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/271336/Hookes-law>>.
9. Fialová, L.; Vejražka, M.: *Metabolismus vápníku a fosforu* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/Kost-teorievseobecni0910%20_3_.pdf >.
10. Havránek, A.: *Reologie a její aplikace na biolátky*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.ftvs.cuni.cz/elstudovna/download.php?dir=./obsah/abi/doc&soubor=Reologie.doc>>.

11. Heaney, Robert P.: *Dairy and Bone Health*. Journal of the American College of Nutrition [online]. [cit. 2012-09-24]. Dostupný z WWW: <http://www.jacn.org/cgi/content/full/28/Supplement_1/82S>.
12. Horníček, J.: *Osteomalacie a rachitis, Pagetova kostní nemoc, renální osteodystrofie, osteogenezis imperfekta, osteopetróza, hypofosfatazémie* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://medici2011.ic.cz/patofyziologie_referaty_ENDOKRINOLOGIE/Osteomalacie_rachitis.ppt>.
13. Chanda, M; Roy, Salil K.: *Plastics Technology Handbook*. Čtvrté vydání. New York: CRC Press, 2006. s. 3-19-3-20
14. Instinkt: *Patří budoucnost prasatům* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://instinkt.tyden.cz/rubriky/ostatni/zdravi/patri-budoucnost-prasatum_26523.html>.
15. Intech: *Rheologic model*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.intechopen.com/source/html/42681/media/image25.jpeg>>.
16. Intech: *Rheology – theory and application to biomaterials*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.intechopen.com/books/polymerization/rheology-theory-and-application-to-biomaterials>>.
17. Kaucká, M.: *Zákonitosti tvorby kostní tkáně*. Bakalářská práce. [online]. 2006, [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <is.muni.cz/th/105967/prif_b/bakalarska_prace.doc>.
18. König, H. E.; Liebich, H. G.: *Anatomie domácích savců*. Druhé vydání. Praha: Hajko & Hajková, 2002. s. 136-224
19. Konvičková, S.; Valenta J.: *Biomechanika člověka. Svalově kosterní systém II. díl*. Druhé vydání. Praha: ČVUT, 2007. 175 s.
20. Kutílek, Š.; Hála, T.; Feřtek, D.: *Osteoporóza – stále aktuální problém*. Remedia [online]. [cit. 2013-09-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.remédia.cz/Okruh-temat/Osteologie/Osteoporoz-a-stale-aktualni-problem/8-1i-gk.magarticle.aspx>>.

21. Kutílek, Š; Řeháčková, P.: *Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost*. Remedica, roč. 2013. č. 3, s. 2-6
22. Kutinová, B. a kol.: *Technický slovník naučný*. Druhé vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983. 564 s.
23. Lopot, F.: *Reologie a biomechanika – aplikace modelů*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW:
<http://www.ftvs.cuni.cz/elstudovna/download.php?dir=./obsah/abi/doc&soubor=Reologie_a_biomechanika.doc>.
24. Marand, H.: *Polymer viscoelasticity*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW:
<<http://www.files.chem.vt.edu/chem-dept/marand/Lecture20.pdf>>.
25. Mezger, G. T.: *The Rheology handbook – for users of rotational and oscillatory rheometers*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW:
<<http://books.google.cz/books?id=N9Fdn0MEIDIC&pg=PA100&lpg=PA100&dq=generalized+kelvin+voigt+model&source=bl&ots=pMyaUWZts0&sig=E3vhs22cfUCtfijhblD257td0r8&hl=cs&sa=X&ei=q0sTUq6mNIjPtAbvn4DIAQ&ved=0CEEQ6AEwAg#v=onepage&q=generalized%20kelvin%20voigt%20model&f=false>>.
26. Patobiomechanika a patokinesiologie kompendium: *Mechanické vlastnosti kostní tkáně* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW:
<http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpbk/kompendium/biomechanika/vlastnosti_tkane_kostni.php>.
27. Patologie pro speciální pedagogy: *Rachitis a osteomalacie* [online]. [cit. 2013-09-14]. Dostupný z WWW:
<http://pasp.upol.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=63:rachitis&catid=25:onemocni-pohyboveho-systemu&Itemid=5>.
28. Roušarová, P.: *Vliv parametrů vzorků na mechanické vlastnosti biologických materiálů*. Hradec Králové, 2012. 90 s. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Diplomová práce.
29. Stapro: *Kostní metabolismus* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW:
<ciselnyky.dasta.stapro.cz/hypertext/201310/hypertext/AJFNU.htm>.

30. Suchopár, J. a kolektiv.: *Remedia Compendium*. Čtvrté vydání. Praha: Panax, 2009. s. 521-532
31. Turner, A. Simon: *Animal models of osteoporosis – necessity and limitations* [online]. 2001, [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol001/pdf/v001a08.pdf>>.
32. Veselý, O.: *Vitamin D a křivice či osteomalacie*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki2/?p=8255>>.
33. Vyskočil, V.: *Osteoporóza a ostatní nejčastější metabolická onemocnění skeletu*. První vydání. Praha: Galén, 2009. 507 s.
34. Wikipedia: *Mechanical rezonance*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Mechanical_rezonance>.
35. Wikipedia: *Viscoelasticity*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Viscoelasticity>>.
36. Wikipedie : *Lidská kostra* [online]. 2012, [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lidsk%C3%A1_kostra>.
37. Wikipedie: *Kost*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kost>>.
38. Wikipedie: *Teorie plasticity*. [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Teorie_plasticity>.
39. Wikiskripta: *Pagetova choroba* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Pagetova_choroba>.
40. Základy kineziologie: *Funkční anatomie a biomechanika kostní tkáně* [online]. [cit. 2013-09-15]. Dostupný z WWW: <<http://vos.palestra.cz/skripta/kineziologie/1a1a3.htm>>.
41. Živný, P.; Palička, V.; Vyskočil, V.: *Pagetova choroba*. Postgraduální medicína [online]. [cit. 2012-07-23]. Dostupný z WWW: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/pagetova-choroba-461277>>.

42. Rauh, M.; Verwied, S.; Knerr, I.; Dörr, HG.; Sönnichsen, A.; Koletzko, B.: *Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. Amino Acids* [online]. 2001;20:409-18. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452984>>.
43. Stanger, O.; Herrmann, W.; Pietrzik, K.; Fowler, B.; Geisel, J.; Dierkes, J.; Weger, M.; DACH-LIGA Homocystein e.V. *DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): Consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations.* [online]. 2003;41:1392-1403. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656016>>.
44. Riddell, LJ.; Chisholm, A.; Duncan, A.; Mann, JI.: *Homocysteine levels in healthy New Zealanders and those with vascular disease.* [online]. 1999;112:438-42. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678241>>.
45. Kutilek, S.; Nemeč, V.; Bockayova, E.: *Elevated serum homocysteine levels in paediatric patients with primary Raynaud's phenomenon.* [online]. 2012;52:125-30 [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286653>>.
46. Bozkurt, N.; Erdem, M.; Yilmaz, E.; Erdem, A.; Biri, A.; Kubatova, A.; Bozkurt, M.: *The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women.* [online]. 2009;280:381-7. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151987>>.
47. Bucciarelli, P.; Martini, G.; Martinelli, I.; Ceccarelli, E.; Gennari, L.; Bader, R.; Valenti, R.; Franci, B.; Nuti, R.; Mannucci, PM.: *The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in post-menopausal women.* [online]. 2010;21:301-5. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603040>>.

48. Haliloglu, B.; Aksungar, FB.; Ilter, E.; Peker, H.; Akin, FT.; Mutlu, N.; Ozekici, U.: *Relationship between bone mineral density, bone turnover markers and homocysteine, folate and vitamin B12 levels in postmenopausal women.* [online]. 2010;281:663-8. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946695>>.
49. Krivosíková, Z.; Krajcovicová-Kudlácková, M.; Spustová, V.; Stefková, K.; Valachovicová, M.; Blazíček, P.; Němcová, T.: *The association between high plasma homocysteine levels and lower bone mineral density in Slovak women: the impact of vegetarian diet.* [online]. 2010;49:147-53. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19809862>>.
50. Levasseur, R.: *Bone tissue and hyperhomocysteinemia.* [online]. 2009;76:234-40. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217816>>.
51. Leboff, MS.; Narweker, R.; LaCroix, A.; Wu, L.; Jackson, R.; Lee, J.; Bauer, DC.; Cauley, J.; Kooperberg, C.; Lewis, C.; Thomas, AM.; Cummings, S.: *Homocysteine levels and risk of hip fracture in postmenopausal women.* [online]. 2009;94:1207-13. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174498>>.
52. Ouzzif, Z.; Oumghar, K.; Sbai, K.; Mounach, A.; Derouiche, EM.; El Maghraoui, A.: *Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal women.* [online]. 2010;32:123-8. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676649>>.
53. Shiraki, M.; Kuroda, T.; Shiraki, Y.; Tanaka, S.; Higuchi, T.; Saito, M.: *Urinary pentosidine and plasma homocysteine levels at baseline predict future fractures in osteoporosis patients under bisphosphonate treatment.* [online]. 2011;29:62-70. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458602>>.
54. Yilmaz, N.; Eren, E.: *Homocysteine oxidative stress and relation to bone mineral density in post-menopausal osteoporosis.* [online]. 2009;21:353-7. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19959926>>.

55. Kobzova, J.; Vignerova, J.; Blaha, P.; Krejcovsky, L.; Riedlová, J.: *The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001*. [online]. 2004;12:126-130. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://apps.szu.cz/svi/cejph/archiv/2004-3-02-full.pdf>>.
56. Nemeč, V.; Bockayova, E.; Kutilek, Š.: *Serum homocysteine levels in Czech children and adolescents*. [online]. 2012;55:87-90. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <http://orbis.lfhk.cuni.cz/Acta_Medica/2012/2012_87.pdf>.
57. Kutilek, S.; Bayer, M.: *Total serum alkaline phosphatase activity and its relationship to age and growth in children*. Osteologický bulletin, Praha: Trios, 2003;8: s. 52-55.
58. Crofton, PM.; Evans, N.; Taylor, MRH.; Holland, CV.: *Serum CrossLaps: Pediatric reference intervals from birth to 19 years of age*. [online]. 2002;48, 671-3. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901074>>.
59. Clark, EM.; Ness, AR.; Bishop, NJ.; Tobias, JH.: *Association between bone mass and fractures in children: A prospective cohort study*. [online]. 2006;21:1489-95. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939408>>.
60. Clark, EM.; Tobias, JH.; Ness, AR.: *Association between bone density and fractures in children: a systematic review and meta-analysis*. [online]. 2006;117:291-7. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452336>>.
61. Vaes, BL.; Lute, C.; Blom, HJ.; Bravenboer, N.; de Vries, TJ.; Everts, V.; Dhonukshe-Rutten, RA.; Müller, M.; de Groot, LC.; Steegenga, WT.: *Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid*. [online]. 2009;84:413-22. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363664>>.

62. Herrmann, M.; Tami, A.; Wildemann, B.; Wolny, M.; Wagner, A.; Schorr, H.; Taban-Shomal, O.; Umanskaya, N.; Ross, S.; Garcia, P.; Hübner, U.; Herrmann, W.: *Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone*. [online]. 2009;44:467-75. [cit. 2012-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056526>>.
63. Projekt zdraví: *Praeostin*. [online]. [cit. 2013-10-11]. Dostupný z WWW: <http://www.ceskyprojektzdрави.cz/slozeni_praeostin.htm>.
64. Harvard Health Publications: *B vitamins and homocysteine*. [online]. [cit. 2013-10-11]. Dostupný z WWW: <http://www.health.harvard.edu/newsweek/B_vitamins_and_homocysteine.htm>.
65. Erben, K.: *Homocystein klíč ke zdraví*. [online]. [cit. 2013-10-11]. Dostupný z WWW: <http://www.rozkvet.cz/shop/podstranky_shopu/erben.htm>.
66. Claes, L.; Schmalenbach, J.; Herrmann, M.; Olku, I.; Garcia, P.; Histing, T.; Obeid, R.; Schorr, H.; Herrmann, W.; Pohlemann, T.; Menger, MD.; Holstein, JH.: *Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice*. [online]. 2009;85:17-21. [cit. 2012-06-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19533012>>.
67. Hála, T.: *Rizikové faktory osteoporózy*. [online]. [cit. 2013-10-11]. Dostupný z WWW: <<http://medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2005/04/04.pdf>>.
68. Horák, P.: *Léčba osteoporózy žena a mužů stroncium ranelátem*. [online]. [cit. 2013-10-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2013/05/11.pdf>>.
69. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.: *Denosumab a léčba osteoporózy – nové poznatky*. Klimakterická medicína, Praha, 2013; 18:5-8
70. Wikipedia: *Homocysteine*. [online]. [cit. 2013-10-1]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Homocysteine>>.

9 PŘÍLOHY

9.1 Tabulky naměřených hodnot

1. série měření							
Vzorek	Měření	Tlumení amplitud	Průměrná frekvence	Hookeův koeficient	Newtonův koeficient	Dynamický modul	Viskozita
č.	den	Q1	f [Hz]	H [N.m ⁻¹]	N [N.s.m ⁻¹]	E _D [Pa]	η [Pa.s]
1	0	1,1	9,9	1,74E+02	9,75E-02	4,87E+07	2,73E+04
1	0	1,1	10,0	1,74E+02	9,53E-02	4,87E+07	2,67E+04
1	0	1,1	10,0	1,75E+02	9,36E-02	4,89E+07	2,62E+04
1	0	1,0	10,0	1,77E+02	9,24E-02	4,95E+07	2,59E+04
1	0	1,1	10,0	1,76E+02	9,46E-02	4,93E+07	2,65E+04
1	0	1,0	10,0	1,76E+02	9,29E-02	4,93E+07	2,60E+04
1	0	1,0	10,0	1,77E+02	9,32E-02	4,96E+07	2,61E+04
1	0	1,0	10,0	1,76E+02	9,29E-02	4,93E+07	2,60E+04
1	0	1,0	10,0	1,77E+02	9,16E-02	4,96E+07	2,57E+04
1	0	1,0	10,0	1,77E+02	9,19E-02	4,96E+07	2,57E+04
2	0	1,4	10,3	1,87E+02	1,24E-01	2,54E+07	1,68E+04
2	0	1,4	10,3	1,88E+02	1,21E-01	2,55E+07	1,65E+04
2	0	1,3	10,4	1,89E+02	1,20E-01	2,56E+07	1,63E+04
2	0	1,3	10,4	1,89E+02	1,19E-01	2,57E+07	1,62E+04
2	0	1,3	10,4	1,89E+02	1,19E-01	2,56E+07	1,62E+04
2	0	1,3	10,4	1,91E+02	1,19E-01	2,59E+07	1,62E+04
2	0	1,3	10,4	1,89E+02	1,18E-01	2,57E+07	1,60E+04
2	0	1,3	10,4	1,90E+02	1,19E-01	2,58E+07	1,61E+04
2	0	1,3	10,4	1,91E+02	1,17E-01	2,59E+07	1,59E+04
2	0	1,3	10,4	1,90E+02	1,17E-01	2,58E+07	1,59E+04
3	0	0,7	11,3	2,26E+02	6,00E-02	5,20E+07	1,38E+04
3	0	0,6	11,3	2,25E+02	5,65E-02	5,19E+07	1,30E+04
3	0	0,6	11,3	2,25E+02	5,52E-02	5,18E+07	1,27E+04
3	0	0,6	11,4	2,27E+02	5,42E-02	5,24E+07	1,25E+04
3	0	0,6	11,4	2,27E+02	5,35E-02	5,23E+07	1,23E+04
3	0	0,6	11,4	2,27E+02	5,35E-02	5,22E+07	1,23E+04
3	0	0,5	11,5	2,30E+02	4,82E-02	5,31E+07	1,11E+04
3	0	0,5	11,5	2,31E+02	4,82E-02	5,32E+07	1,11E+04
3	0	0,6	11,5	2,30E+02	5,19E-02	5,31E+07	1,20E+04
3	0	0,6	11,5	2,31E+02	4,91E-02	5,31E+07	1,13E+04
4	0	1,1	14,0	3,44E+02	9,58E-02	1,81E+07	5,04E+03
4	0	1,1	14,0	3,46E+02	9,40E-02	1,82E+07	4,95E+03
4	0	1,0	14,1	3,47E+02	9,33E-02	1,83E+07	4,91E+03

4	0	1,0	14,1	3,48E+02	9,13E-02	1,83E+07	4,80E+03
4	0	1,0	14,1	3,48E+02	9,21E-02	1,83E+07	4,85E+03
4	0	1,0	14,1	3,47E+02	9,28E-02	1,83E+07	4,88E+03
4	0	1,0	14,1	3,48E+02	9,14E-02	1,83E+07	4,81E+03
4	0	1,0	14,1	3,48E+02	9,18E-02	1,83E+07	4,83E+03
4	0	1,0	14,0	3,46E+02	9,06E-02	1,82E+07	4,77E+03
4	0	1,0	14,1	3,49E+02	9,12E-02	1,83E+07	4,80E+03
5	0	0,7	13,2	3,04E+02	6,45E-02	3,13E+07	6,65E+03
5	0	0,7	13,1	3,04E+02	6,36E-02	3,13E+07	6,55E+03
5	0	0,7	13,1	3,04E+02	6,42E-02	3,13E+07	6,61E+03
5	0	0,7	13,2	3,05E+02	6,32E-02	3,14E+07	6,51E+03
5	0	0,7	13,1	3,04E+02	6,29E-02	3,13E+07	6,48E+03
5	0	0,7	13,1	3,04E+02	6,27E-02	3,13E+07	6,46E+03
5	0	0,7	13,1	3,04E+02	6,29E-02	3,13E+07	6,48E+03
5	0	0,7	13,2	3,05E+02	6,32E-02	3,14E+07	6,51E+03
5	0	0,7	13,2	3,04E+02	6,18E-02	3,13E+07	6,37E+03
5	0	0,7	13,2	3,05E+02	6,28E-02	3,14E+07	6,47E+03
6	0	1,0	12,7	2,85E+02	8,59E-02	2,89E+07	8,71E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	8,33E-02	2,88E+07	8,44E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	8,45E-02	2,88E+07	8,57E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	8,23E-02	2,88E+07	8,34E+03
6	0	0,9	12,7	2,85E+02	8,17E-02	2,89E+07	8,28E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	8,09E-02	2,87E+07	8,20E+03
6	0	0,9	12,7	2,85E+02	8,00E-02	2,89E+07	8,11E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	8,13E-02	2,88E+07	8,24E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	7,94E-02	2,88E+07	8,05E+03
6	0	0,9	12,7	2,84E+02	7,96E-02	2,88E+07	8,06E+03
7	0	0,9	14,5	3,70E+02	8,11E-02	2,34E+07	5,14E+03
7	0	0,9	14,5	3,72E+02	8,16E-02	2,36E+07	5,17E+03
7	0	0,9	14,5	3,72E+02	8,15E-02	2,36E+07	5,16E+03
7	0	0,9	14,6	3,73E+02	8,18E-02	2,36E+07	5,18E+03
7	0	0,9	14,6	3,74E+02	8,20E-02	2,37E+07	5,19E+03
7	0	0,9	14,6	3,74E+02	8,23E-02	2,37E+07	5,22E+03
7	0	0,9	14,6	3,76E+02	8,17E-02	2,38E+07	5,18E+03
7	0	0,9	14,6	3,75E+02	8,19E-02	2,38E+07	5,19E+03
7	0	0,9	14,6	3,77E+02	8,28E-02	2,39E+07	5,25E+03
7	0	0,9	14,6	3,76E+02	8,25E-02	2,38E+07	5,23E+03
8	0	0,8	13,0	2,99E+02	7,03E-02	3,48E+07	8,19E+03
8	0	0,8	13,0	2,98E+02	7,04E-02	3,47E+07	8,20E+03
8	0	0,8	13,1	3,00E+02	7,10E-02	3,50E+07	8,27E+03
8	0	0,7	13,0	2,98E+02	6,42E-02	3,48E+07	7,48E+03
8	0	0,7	13,1	2,99E+02	6,66E-02	3,49E+07	7,76E+03
8	0	0,7	13,1	3,00E+02	6,57E-02	3,50E+07	7,65E+03
8	0	0,7	13,1	3,01E+02	6,61E-02	3,50E+07	7,70E+03
8	0	0,7	13,1	3,00E+02	6,31E-02	3,49E+07	7,35E+03
8	0	0,7	13,1	3,01E+02	6,33E-02	3,50E+07	7,37E+03

8	0	0,7	13,1	3,01E+02	6,31E-02	3,50E+07	7,35E+03
1	1	1,1	9,6	1,61E+02	9,41E-02	4,50E+07	2,64E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,33E-02	4,50E+07	2,61E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,29E-02	4,50E+07	2,60E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,14E-02	4,51E+07	2,56E+04
1	1	1,0	9,6	1,60E+02	9,12E-02	4,49E+07	2,55E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,18E-02	4,50E+07	2,57E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,15E-02	4,51E+07	2,56E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,17E-02	4,51E+07	2,57E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,07E-02	4,51E+07	2,54E+04
1	1	1,0	9,6	1,61E+02	9,03E-02	4,52E+07	2,53E+04
2	1	1,0	10,5	1,95E+02	8,68E-02	2,64E+07	1,18E+04
2	1	1,0	10,6	1,97E+02	8,88E-02	2,67E+07	1,20E+04
2	1	1,0	10,6	1,97E+02	8,85E-02	2,67E+07	1,20E+04
2	1	1,0	10,6	1,96E+02	8,85E-02	2,66E+07	1,20E+04
2	1	1,0	10,5	1,95E+02	8,74E-02	2,65E+07	1,19E+04
2	1	1,0	10,6	1,97E+02	8,86E-02	2,67E+07	1,20E+04
2	1	1,0	10,6	1,98E+02	8,86E-02	2,69E+07	1,20E+04
2	1	1,0	10,6	1,97E+02	8,91E-02	2,67E+07	1,21E+04
2	1	1,0	10,6	1,99E+02	8,90E-02	2,70E+07	1,21E+04
2	1	1,0	10,6	1,97E+02	8,91E-02	2,67E+07	1,21E+04
3	1	0,8	12,1	2,57E+02	7,43E-02	6,15E+07	1,78E+04
3	1	0,9	12,2	2,60E+02	7,71E-02	6,21E+07	1,84E+04
3	1	0,8	12,1	2,59E+02	7,23E-02	6,20E+07	1,73E+04
3	1	0,8	12,2	2,61E+02	7,39E-02	6,23E+07	1,77E+04
3	1	0,8	12,1	2,59E+02	7,39E-02	6,20E+07	1,77E+04
3	1	0,8	12,2	2,60E+02	7,27E-02	6,22E+07	1,74E+04
3	1	0,8	12,2	2,60E+02	7,19E-02	6,22E+07	1,72E+04
3	1	0,8	12,2	2,60E+02	7,22E-02	6,22E+07	1,73E+04
3	1	0,8	12,2	2,61E+02	7,05E-02	6,23E+07	1,69E+04
3	1	0,8	12,2	2,61E+02	7,00E-02	6,25E+07	1,67E+04
4	1	1,1	14,7	3,78E+02	9,69E-02	1,99E+07	5,10E+03
4	1	1,1	14,7	3,78E+02	9,45E-02	1,99E+07	4,97E+03
4	1	1,1	14,7	3,78E+02	9,38E-02	1,99E+07	4,94E+03
4	1	1,1	14,7	3,78E+02	9,41E-02	1,99E+07	4,95E+03
4	1	1,1	14,7	3,77E+02	9,69E-02	1,99E+07	5,10E+03
4	1	1,1	14,7	3,79E+02	9,36E-02	1,99E+07	4,93E+03
4	1	1,0	14,6	3,73E+02	9,13E-02	1,96E+07	4,80E+03
4	1	1,0	14,5	3,72E+02	9,12E-02	1,96E+07	4,80E+03
4	1	1,1	14,5	3,72E+02	9,36E-02	1,96E+07	4,93E+03
4	1	1,0	14,5	3,72E+02	9,33E-02	1,96E+07	4,91E+03
5	1	0,9	14,2	3,54E+02	8,16E-02	3,38E+07	7,78E+03
5	1	0,9	14,2	3,54E+02	8,05E-02	3,38E+07	7,68E+03
5	1	0,9	14,2	3,55E+02	7,97E-02	3,38E+07	7,60E+03
5	1	0,9	14,2	3,54E+02	7,97E-02	3,38E+07	7,61E+03
5	1	0,9	14,2	3,56E+02	7,86E-02	3,39E+07	7,50E+03

5	1	0,9	14,2	3,55E+02	7,89E-02	3,39E+07	7,53E+03
5	1	0,9	14,2	3,56E+02	7,76E-02	3,39E+07	7,41E+03
5	1	0,9	14,2	3,56E+02	7,80E-02	3,40E+07	7,45E+03
5	1	0,9	14,2	3,55E+02	7,81E-02	3,39E+07	7,45E+03
5	1	0,9	14,2	3,56E+02	7,75E-02	3,40E+07	7,39E+03
6	1	0,9	12,6	2,80E+02	8,17E-02	2,84E+07	8,28E+03
6	1	1,0	12,5	2,77E+02	8,46E-02	2,81E+07	8,58E+03
6	1	0,8	12,5	2,74E+02	7,21E-02	2,78E+07	7,31E+03
6	1	0,8	12,5	2,74E+02	7,23E-02	2,78E+07	7,33E+03
6	1	0,8	12,5	2,75E+02	7,15E-02	2,79E+07	7,25E+03
6	1	0,8	12,5	2,75E+02	7,18E-02	2,79E+07	7,28E+03
6	1	0,8	12,5	2,76E+02	6,93E-02	2,80E+07	7,02E+03
6	1	0,8	12,5	2,76E+02	6,96E-02	2,79E+07	7,05E+03
6	1	0,8	12,5	2,76E+02	6,86E-02	2,79E+07	6,96E+03
6	1	0,8	12,5	2,75E+02	6,98E-02	2,79E+07	7,07E+03
7	1	0,9	14,5	3,71E+02	8,36E-02	2,49E+07	5,61E+03
7	1	0,9	14,6	3,75E+02	8,21E-02	2,51E+07	5,50E+03
7	1	0,9	14,6	3,72E+02	8,10E-02	2,50E+07	5,43E+03
7	1	0,9	14,6	3,73E+02	8,19E-02	2,50E+07	5,49E+03
7	1	0,9	14,6	3,75E+02	8,12E-02	2,51E+07	5,44E+03
7	1	0,9	14,6	3,74E+02	8,14E-02	2,51E+07	5,46E+03
7	1	0,9	14,6	3,73E+02	8,11E-02	2,50E+07	5,44E+03
7	1	0,9	14,6	3,73E+02	8,09E-02	2,50E+07	5,42E+03
7	1	0,9	14,6	3,73E+02	8,20E-02	2,50E+07	5,50E+03
7	1	0,9	14,6	3,73E+02	8,06E-02	2,50E+07	5,41E+03
8	1	0,9	13,2	3,08E+02	8,25E-02	3,84E+07	1,03E+04
8	1	0,9	13,2	3,08E+02	8,20E-02	3,84E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,23E-02	3,85E+07	1,03E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,18E-02	3,85E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,16E-02	3,85E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,23E-02	3,85E+07	1,03E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,14E-02	3,85E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,09E+02	8,18E-02	3,85E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,10E+02	8,15E-02	3,87E+07	1,02E+04
8	1	0,9	13,3	3,10E+02	8,16E-02	3,86E+07	1,02E+04
1	3	1,1	9,6	1,63E+02	9,52E-02	4,58E+07	2,67E+04
1	3	1,1	9,7	1,64E+02	9,59E-02	4,61E+07	2,68E+04
1	3	1,1	9,7	1,63E+02	9,57E-02	4,58E+07	2,68E+04
1	3	1,1	9,7	1,66E+02	9,45E-02	4,64E+07	2,65E+04
1	3	1,1	9,7	1,64E+02	9,41E-02	4,59E+07	2,63E+04
1	3	1,0	9,7	1,66E+02	9,29E-02	4,64E+07	2,60E+04
1	3	1,0	9,7	1,65E+02	9,28E-02	4,63E+07	2,60E+04
1	3	1,0	9,7	1,65E+02	9,28E-02	4,63E+07	2,60E+04
1	3	1,1	9,7	1,67E+02	9,39E-02	4,67E+07	2,63E+04
1	3	1,0	9,7	1,66E+02	9,32E-02	4,66E+07	2,61E+04
2	3	0,9	10,2	1,84E+02	7,59E-02	2,50E+07	1,03E+04

2	3	0,8	10,2	1,83E+02	7,41E-02	2,49E+07	1,01E+04
2	3	0,8	10,2	1,84E+02	7,42E-02	2,50E+07	1,01E+04
2	3	0,8	10,2	1,84E+02	7,36E-02	2,50E+07	9,98E+03
2	3	0,8	10,2	1,84E+02	7,25E-02	2,50E+07	9,84E+03
2	3	0,8	10,3	1,85E+02	7,41E-02	2,51E+07	1,00E+04
2	3	0,8	10,3	1,85E+02	7,53E-02	2,51E+07	1,02E+04
2	3	0,8	10,2	1,84E+02	7,44E-02	2,50E+07	1,01E+04
2	3	0,9	10,2	1,84E+02	7,62E-02	2,50E+07	1,03E+04
2	3	0,8	10,3	1,85E+02	7,36E-02	2,50E+07	9,99E+03
3	3	0,8	12,4	2,71E+02	7,26E-02	6,61E+07	1,77E+04
3	3	0,8	12,4	2,71E+02	7,13E-02	6,60E+07	1,74E+04
3	3	0,8	12,5	2,74E+02	6,94E-02	6,68E+07	1,69E+04
3	3	0,8	12,4	2,72E+02	6,94E-02	6,64E+07	1,69E+04
3	3	0,8	12,5	2,74E+02	6,93E-02	6,67E+07	1,69E+04
3	3	0,8	12,5	2,75E+02	6,89E-02	6,70E+07	1,68E+04
3	3	0,8	12,5	2,75E+02	6,98E-02	6,71E+07	1,70E+04
3	3	0,8	12,5	2,75E+02	6,89E-02	6,69E+07	1,68E+04
3	3	0,8	12,5	2,75E+02	6,92E-02	6,69E+07	1,68E+04
3	3	0,8	12,5	2,76E+02	7,07E-02	6,72E+07	1,72E+04
4	3	0,9	14,6	3,51E+02	7,69E-02	1,74E+07	3,82E+03
4	3	0,9	14,6	3,77E+02	7,64E-02	1,87E+07	3,79E+03
4	3	0,8	14,6	3,74E+02	7,42E-02	1,86E+07	3,68E+03
4	3	0,8	14,7	3,77E+02	7,45E-02	1,87E+07	3,70E+03
4	3	0,8	14,6	3,75E+02	7,45E-02	1,86E+07	3,70E+03
4	3	0,8	14,6	3,76E+02	7,39E-02	1,87E+07	3,67E+03
4	3	0,8	14,6	3,74E+02	7,48E-02	1,86E+07	3,71E+03
4	3	0,8	14,6	3,75E+02	7,42E-02	1,86E+07	3,68E+03
4	3	0,8	14,6	3,75E+02	7,46E-02	1,86E+07	3,70E+03
4	3	0,8	14,6	3,74E+02	7,48E-02	1,86E+07	3,71E+03
5	3	1,0	13,6	3,28E+02	8,94E-02	3,31E+07	9,03E+03
5	3	1,0	13,7	3,29E+02	8,81E-02	3,33E+07	8,90E+03
5	3	1,0	13,7	3,30E+02	8,67E-02	3,34E+07	8,76E+03
5	3	1,0	13,7	3,29E+02	8,50E-02	3,32E+07	8,59E+03
5	3	1,0	13,7	3,29E+02	8,46E-02	3,33E+07	8,56E+03
5	3	1,0	13,7	3,29E+02	8,57E-02	3,33E+07	8,66E+03
5	3	0,9	13,7	3,31E+02	8,44E-02	3,35E+07	8,53E+03
5	3	0,9	13,7	3,31E+02	8,31E-02	3,35E+07	8,40E+03
5	3	0,9	13,7	3,32E+02	8,43E-02	3,36E+07	8,52E+03
5	3	1,0	13,7	3,31E+02	8,46E-02	3,34E+07	8,55E+03
6	3	0,9	12,7	2,81E+02	7,60E-02	3,02E+07	8,14E+03
6	3	0,8	12,7	2,84E+02	7,34E-02	3,05E+07	7,86E+03
6	3	0,8	12,7	2,82E+02	7,44E-02	3,03E+07	7,97E+03
6	3	0,8	12,7	2,85E+02	7,26E-02	3,05E+07	7,77E+03
6	3	0,8	12,7	2,84E+02	7,33E-02	3,05E+07	7,85E+03
6	3	0,8	12,7	2,84E+02	7,20E-02	3,04E+07	7,71E+03
6	3	0,8	12,7	2,85E+02	7,04E-02	3,06E+07	7,54E+03

6	3	0,8	12,7	2,84E+02	7,04E-02	3,04E+07	7,54E+03
6	3	0,8	12,7	2,84E+02	6,90E-02	3,04E+07	7,39E+03
6	3	0,8	12,7	2,85E+02	6,84E-02	3,06E+07	7,33E+03
7	3	1,2	14,2	3,54E+02	1,09E-01	2,46E+07	7,58E+03
7	3	1,2	14,3	3,58E+02	1,09E-01	2,49E+07	7,57E+03
7	3	1,2	14,2	3,56E+02	1,09E-01	2,48E+07	7,61E+03
7	3	1,2	14,2	3,55E+02	1,09E-01	2,47E+07	7,56E+03
7	3	1,2	14,2	3,56E+02	1,08E-01	2,47E+07	7,52E+03
7	3	1,2	14,3	3,57E+02	1,10E-01	2,48E+07	7,64E+03
7	3	1,3	14,2	3,55E+02	1,13E-01	2,47E+07	7,84E+03
7	3	1,2	14,2	3,54E+02	1,10E-01	2,46E+07	7,67E+03
7	3	1,2	14,2	3,54E+02	1,10E-01	2,47E+07	7,63E+03
7	3	1,2	14,2	3,55E+02	1,09E-01	2,47E+07	7,60E+03
8	3	1,1	12,9	2,92E+02	1,00E-01	3,64E+07	1,25E+04
8	3	1,1	12,9	2,94E+02	9,68E-02	3,67E+07	1,21E+04
8	3	1,1	12,9	2,94E+02	9,59E-02	3,67E+07	1,20E+04
8	3	1,1	12,9	2,92E+02	9,50E-02	3,65E+07	1,18E+04
8	3	1,1	13,0	2,96E+02	9,54E-02	3,69E+07	1,19E+04
8	3	1,1	12,9	2,93E+02	9,55E-02	3,65E+07	1,19E+04
8	3	1,1	12,9	2,95E+02	9,51E-02	3,68E+07	1,19E+04
8	3	1,1	12,9	2,94E+02	9,45E-02	3,66E+07	1,18E+04
8	3	1,1	12,9	2,93E+02	9,45E-02	3,66E+07	1,18E+04
8	3	1,1	12,9	2,94E+02	9,41E-02	3,67E+07	1,17E+04
1	7	1,2	9,7	1,49E+02	1,07E-01	4,34E+07	3,13E+04
1	7	1,2	9,8	1,67E+02	1,03E-01	4,88E+07	3,00E+04
1	7	1,2	9,8	1,67E+02	1,05E-01	4,88E+07	3,05E+04
1	7	1,2	9,8	1,67E+02	1,02E-01	4,87E+07	2,99E+04
1	7	1,1	9,8	1,67E+02	1,01E-01	4,88E+07	2,95E+04
1	7	1,2	9,8	1,67E+02	1,03E-01	4,86E+07	2,99E+04
1	7	1,1	9,8	1,68E+02	1,00E-01	4,89E+07	2,92E+04
1	7	1,1	9,8	1,67E+02	9,98E-02	4,87E+07	2,91E+04
1	7	1,1	9,8	1,68E+02	1,01E-01	4,89E+07	2,93E+04
1	7	1,1	9,8	1,68E+02	9,89E-02	4,90E+07	2,88E+04
2	7	0,8	10,5	1,93E+02	7,00E-02	2,57E+07	9,32E+03
2	7	0,8	10,5	1,93E+02	6,99E-02	2,57E+07	9,30E+03
2	7	0,8	10,5	1,95E+02	7,09E-02	2,60E+07	9,44E+03
2	7	0,8	10,5	1,93E+02	6,88E-02	2,57E+07	9,16E+03
2	7	0,8	10,5	1,94E+02	6,77E-02	2,58E+07	9,01E+03
2	7	0,8	10,5	1,93E+02	6,85E-02	2,57E+07	9,12E+03
2	7	0,8	10,5	1,94E+02	6,84E-02	2,58E+07	9,11E+03
2	7	0,8	10,5	1,94E+02	6,81E-02	2,59E+07	9,06E+03
2	7	0,8	10,5	1,94E+02	6,86E-02	2,58E+07	9,13E+03
2	7	0,7	10,5	1,93E+02	6,68E-02	2,57E+07	8,89E+03
3	7	0,9	12,7	2,81E+02	7,73E-02	6,72E+07	1,85E+04
3	7	0,9	12,7	2,81E+02	8,11E-02	6,73E+07	1,94E+04
3	7	0,9	12,7	2,82E+02	7,75E-02	6,74E+07	1,85E+04

3	7	0,9	12,7	2,82E+02	7,92E-02	6,74E+07	1,89E+04
3	7	0,8	12,7	2,82E+02	7,55E-02	6,74E+07	1,80E+04
3	7	0,9	12,7	2,83E+02	7,77E-02	6,75E+07	1,86E+04
3	7	0,9	12,7	2,85E+02	8,14E-02	6,81E+07	1,95E+04
3	7	0,9	12,7	2,84E+02	7,99E-02	6,79E+07	1,91E+04
3	7	0,9	12,7	2,84E+02	8,03E-02	6,80E+07	1,92E+04
3	7	0,9	12,7	2,86E+02	7,77E-02	6,83E+07	1,86E+04
4	7	1,0	14,8	3,83E+02	8,82E-02	1,90E+07	4,38E+03
4	7	1,0	14,8	3,86E+02	8,54E-02	1,92E+07	4,24E+03
4	7	0,9	14,8	3,85E+02	8,43E-02	1,91E+07	4,18E+03
4	7	1,0	14,8	3,84E+02	8,47E-02	1,91E+07	4,21E+03
4	7	0,9	14,8	3,85E+02	8,24E-02	1,91E+07	4,09E+03
4	7	1,0	14,8	3,84E+02	8,61E-02	1,91E+07	4,27E+03
4	7	0,9	14,8	3,85E+02	8,35E-02	1,91E+07	4,14E+03
4	7	1,0	14,8	3,84E+02	8,50E-02	1,91E+07	4,22E+03
4	7	1,0	14,8	3,85E+02	8,67E-02	1,91E+07	4,30E+03
4	7	1,0	14,8	3,86E+02	8,66E-02	1,92E+07	4,30E+03
5	7	1,0	13,7	3,31E+02	9,07E-02	3,35E+07	9,17E+03
5	7	1,1	13,8	3,33E+02	9,43E-02	3,37E+07	9,54E+03
5	7	1,0	13,7	3,32E+02	9,02E-02	3,35E+07	9,11E+03
5	7	1,0	13,8	3,33E+02	9,18E-02	3,37E+07	9,28E+03
5	7	1,2	13,8	3,36E+02	1,04E-01	3,40E+07	1,05E+04
5	7	1,2	13,9	3,37E+02	1,04E-01	3,41E+07	1,05E+04
5	7	1,1	13,9	3,38E+02	9,98E-02	3,42E+07	1,01E+04
5	7	1,2	13,8	3,36E+02	1,03E-01	3,40E+07	1,04E+04
5	7	1,1	13,9	3,38E+02	9,81E-02	3,41E+07	9,91E+03
5	7	1,1	13,9	3,37E+02	1,00E-01	3,41E+07	1,01E+04
6	7	0,8	12,7	2,85E+02	7,44E-02	2,94E+07	7,68E+03
6	7	0,8	12,7	2,84E+02	7,37E-02	2,93E+07	7,61E+03
6	7	0,8	12,7	2,86E+02	7,55E-02	2,95E+07	7,80E+03
6	7	0,8	12,8	2,86E+02	7,41E-02	2,95E+07	7,66E+03
6	7	0,8	12,7	2,84E+02	7,36E-02	2,93E+07	7,60E+03
6	7	0,8	12,7	2,85E+02	7,28E-02	2,95E+07	7,52E+03
6	7	0,8	12,7	2,84E+02	7,44E-02	2,94E+07	7,68E+03
6	7	0,8	12,8	2,86E+02	7,27E-02	2,95E+07	7,51E+03
6	7	0,8	12,8	2,58E+02	7,25E-02	2,66E+07	7,48E+03
6	7	0,8	12,7	2,86E+02	7,19E-02	2,95E+07	7,42E+03
7	7	1,0	14,1	3,52E+02	8,65E-02	2,36E+07	5,80E+03
7	7	0,9	14,2	3,53E+02	7,79E-02	2,37E+07	5,22E+03
7	7	1,0	14,1	3,51E+02	8,71E-02	2,36E+07	5,84E+03
7	7	0,9	14,2	3,53E+02	7,88E-02	2,36E+07	5,28E+03
7	7	1,0	14,2	3,52E+02	8,58E-02	2,36E+07	5,75E+03
7	7	0,9	14,1	3,50E+02	8,45E-02	2,35E+07	5,67E+03
7	7	1,0	14,1	3,51E+02	8,62E-02	2,35E+07	5,78E+03
7	7	1,0	14,1	3,51E+02	8,61E-02	2,36E+07	5,77E+03
7	7	0,9	14,2	3,53E+02	8,37E-02	2,36E+07	5,61E+03

7	7	0,9	14,1	3,51E+02	7,82E-02	2,35E+07	5,24E+03
8	7	0,8	13,5	3,22E+02	7,38E-02	3,88E+07	8,90E+03
8	7	0,8	13,6	3,23E+02	7,20E-02	3,90E+07	8,68E+03
8	7	0,8	13,6	3,23E+02	7,10E-02	3,89E+07	8,55E+03
8	7	0,8	13,5	3,23E+02	7,19E-02	3,89E+07	8,67E+03
8	7	0,8	13,6	3,23E+02	7,10E-02	3,90E+07	8,56E+03
8	7	0,8	13,6	3,23E+02	6,96E-02	3,89E+07	8,39E+03
8	7	0,8	13,6	3,24E+02	6,93E-02	3,91E+07	8,36E+03
8	7	0,8	13,6	3,24E+02	6,74E-02	3,90E+07	8,12E+03
8	7	0,8	13,6	3,25E+02	6,75E-02	3,92E+07	8,14E+03
8	7	0,7	13,6	3,25E+02	6,67E-02	3,92E+07	8,04E+03
1	15	1,4	9,5	1,60E+02	1,21E-01	4,49E+07	3,40E+04
1	15	1,4	9,5	1,60E+02	1,21E-01	4,47E+07	3,38E+04
1	15	1,3	9,5	1,59E+02	1,15E-01	4,46E+07	3,21E+04
1	15	1,3	9,5	1,59E+02	1,14E-01	4,45E+07	3,19E+04
1	15	1,4	9,6	1,61E+02	1,21E-01	4,51E+07	3,38E+04
1	15	1,3	9,5	1,60E+02	1,19E-01	4,47E+07	3,34E+04
1	15	1,3	9,5	1,60E+02	1,19E-01	4,48E+07	3,33E+04
1	15	1,3	9,5	1,60E+02	1,15E-01	4,47E+07	3,22E+04
1	15	1,3	9,6	1,61E+02	1,15E-01	4,51E+07	3,23E+04
1	15	1,3	9,6	1,61E+02	1,15E-01	4,50E+07	3,23E+04
2	15	0,8	10,8	2,03E+02	7,28E-02	2,86E+07	1,02E+04
2	15	0,8	10,7	2,02E+02	7,56E-02	2,85E+07	1,06E+04
2	15	0,9	10,8	2,03E+02	7,64E-02	2,86E+07	1,08E+04
2	15	0,9	10,7	2,02E+02	7,93E-02	2,85E+07	1,12E+04
2	15	0,9	10,8	2,04E+02	7,58E-02	2,88E+07	1,07E+04
2	15	0,9	10,8	2,04E+02	7,63E-02	2,87E+07	1,07E+04
2	15	0,8	10,8	2,05E+02	7,56E-02	2,89E+07	1,06E+04
2	15	0,8	10,8	2,07E+02	7,52E-02	2,91E+07	1,06E+04
2	15	0,8	10,8	2,04E+02	7,34E-02	2,88E+07	1,03E+04
2	15	0,8	10,9	2,07E+02	7,44E-02	2,92E+07	1,05E+04
3	15	0,8	12,7	2,83E+02	6,77E-02	6,76E+07	1,62E+04
3	15	0,7	12,7	2,83E+02	6,65E-02	6,77E+07	1,59E+04
3	15	0,7	12,8	2,87E+02	6,03E-02	6,85E+07	1,44E+04
3	15	0,7	12,8	2,86E+02	6,47E-02	6,84E+07	1,55E+04
3	15	0,7	12,8	2,87E+02	5,95E-02	6,85E+07	1,42E+04
3	15	0,7	12,8	2,88E+02	5,88E-02	6,87E+07	1,41E+04
3	15	0,7	12,8	2,87E+02	5,87E-02	6,87E+07	1,40E+04
3	15	0,7	12,8	2,87E+02	5,91E-02	6,85E+07	1,41E+04
3	15	0,7	12,8	2,87E+02	5,85E-02	6,86E+07	1,40E+04
3	15	0,6	12,8	2,88E+02	5,76E-02	6,88E+07	1,38E+04
4	15	0,9	14,7	3,81E+02	7,58E-02	2,01E+07	3,99E+03
4	15	0,9	14,7	3,79E+02	7,79E-02	1,99E+07	4,10E+03
4	15	0,9	14,7	3,79E+02	7,70E-02	2,00E+07	4,05E+03
4	15	0,9	14,7	3,81E+02	7,72E-02	2,01E+07	4,06E+03
4	15	0,9	14,7	3,81E+02	7,69E-02	2,01E+07	4,05E+03

4	15	0,9	14,7	3,80E+02	7,64E-02	2,00E+07	4,02E+03
4	15	0,8	14,7	3,79E+02	7,31E-02	1,99E+07	3,85E+03
4	15	0,9	14,7	3,80E+02	7,57E-02	2,00E+07	3,99E+03
4	15	0,8	14,7	3,81E+02	7,47E-02	2,00E+07	3,93E+03
4	15	0,8	14,7	3,78E+02	7,32E-02	1,99E+07	3,85E+03
5	15	1,1	14,6	3,62E+02	1,02E-01	3,26E+07	9,21E+03
5	15	1,0	14,5	3,70E+02	9,34E-02	3,33E+07	8,40E+03
5	15	1,1	14,5	3,69E+02	9,46E-02	3,32E+07	8,51E+03
5	15	1,1	14,5	3,69E+02	9,55E-02	3,32E+07	8,59E+03
5	15	0,5	14,8	3,83E+02	4,88E-02	3,45E+07	4,39E+03
5	15	1,1	14,5	3,70E+02	9,71E-02	3,33E+07	8,74E+03
5	15	1,1	14,5	3,69E+02	9,67E-02	3,32E+07	8,70E+03
5	15	1,0	14,5	3,71E+02	9,26E-02	3,34E+07	8,34E+03
5	15	1,1	14,6	3,76E+02	9,63E-02	3,39E+07	8,67E+03
5	15	1,0	14,5	3,71E+02	9,31E-02	3,34E+07	8,38E+03
6	15	0,9	12,5	2,76E+02	8,41E-02	3,07E+07	9,34E+03
6	15	0,9	12,5	2,76E+02	8,42E-02	3,06E+07	9,35E+03
6	15	0,9	12,6	2,78E+02	8,33E-02	3,09E+07	9,25E+03
6	15	0,9	12,6	2,79E+02	8,22E-02	3,10E+07	9,13E+03
6	15	0,9	12,6	2,77E+02	8,24E-02	3,08E+07	9,16E+03
6	15	0,9	12,6	2,80E+02	8,25E-02	3,11E+07	9,16E+03
6	15	0,9	12,6	2,79E+02	8,14E-02	3,10E+07	9,05E+03
6	15	0,9	12,6	2,78E+02	8,10E-02	3,09E+07	9,00E+03
6	15	0,9	12,6	2,79E+02	8,09E-02	3,10E+07	8,98E+03
6	15	0,9	12,6	2,78E+02	8,25E-02	3,08E+07	9,17E+03
7	15	0,8	14,1	3,50E+02	6,70E-02	2,14E+07	4,09E+03
7	15	0,8	14,1	3,51E+02	6,73E-02	2,14E+07	4,10E+03
7	15	0,7	14,2	3,52E+02	6,54E-02	2,15E+07	3,99E+03
7	15	0,7	14,2	3,52E+02	6,50E-02	2,15E+07	3,96E+03
7	15	0,7	14,2	3,52E+02	6,45E-02	2,15E+07	3,93E+03
7	15	0,7	14,2	3,52E+02	6,43E-02	2,15E+07	3,92E+03
7	15	0,7	14,1	3,51E+02	6,44E-02	2,14E+07	3,93E+03
7	15	0,7	14,2	3,52E+02	6,38E-02	2,15E+07	3,89E+03
7	15	0,7	14,2	3,53E+02	6,50E-02	2,15E+07	3,96E+03
7	15	0,7	14,1	3,52E+02	6,31E-02	2,14E+07	3,85E+03
8	15	0,8	13,4	3,17E+02	7,03E-02	3,70E+07	8,18E+03
8	15	0,8	13,5	3,18E+02	6,82E-02	3,70E+07	7,94E+03
8	15	0,8	13,5	3,18E+02	6,83E-02	3,71E+07	7,96E+03
8	15	0,7	13,5	3,19E+02	6,58E-02	3,71E+07	7,67E+03
8	15	0,7	13,5	3,19E+02	6,67E-02	3,72E+07	7,77E+03
8	15	0,8	13,5	3,18E+02	6,83E-02	3,71E+07	7,95E+03
8	15	0,8	13,5	3,18E+02	6,74E-02	3,71E+07	7,85E+03
8	15	0,7	13,5	3,20E+02	6,66E-02	3,73E+07	7,75E+03
8	15	0,8	13,5	3,21E+02	6,72E-02	3,74E+07	7,83E+03
8	15	0,7	13,5	3,21E+02	6,67E-02	3,74E+07	7,77E+03

Tabulka 11: Výsledky měření 1. série

2. série měření					
	Kmitavá složka - naměřené hodnoty			Vypočtené hodnoty (Voightův model)	
	Tlumení amplitud	Průměrná frekvence	Hmotnost závaží	Hookův koeficient	Newtonův koeficient
Vzorek	K	f [Hz]	M [g]	H [N.m ⁻¹]	N [N.s.m ⁻¹]
1	1,3	14,3	241,60	1,96E+03	6,24E-01
1	1,3	14,3	241,60	1,96E+03	6,31E-01
1	1,3	14,4	241,60	1,98E+03	6,25E-01
1	1,9	13,8	302,00	2,06E+03	1,12E+00
1	1,4	14,1	302,00	2,15E+03	8,44E-01
1	1,3	13,6	302,00	2,00E+03	8,15E-01
1	1,1	13,4	302,00	1,93E+03	6,55E-01
1	1,0	12,3	362,40	1,96E+03	7,05E-01
1	1,0	12,3	362,40	1,94E+03	7,11E-01
1	1,0	12,3	362,40	1,96E+03	7,10E-01
1	1,0	12,3	362,40	1,96E+03	7,04E-01
1	1,0	12,3	362,40	1,97E+03	7,31E-01
1	0,9	11,1	422,86	1,85E+03	7,36E-01
1	0,9	11,1	422,86	1,86E+03	7,51E-01
1	0,8	11,1	422,86	1,85E+03	6,91E-01
1	0,9	11,1	422,86	1,85E+03	7,69E-01
1	0,9	11,1	422,86	1,86E+03	7,34E-01
1	0,8	9,9	483,34	1,68E+03	7,27E-01
1	0,7	9,9	483,34	1,67E+03	7,21E-01
1	0,7	10,0	483,34	1,69E+03	7,21E-01
1	0,8	10,0	483,34	1,69E+03	7,34E-01
1	0,7	9,9	483,34	1,67E+03	7,10E-01
1	0,7	8,4	565,58	1,37E+03	8,00E-01
1	0,7	8,4	565,58	1,37E+03	7,99E-01
1	0,7	8,4	565,58	1,36E+03	7,41E-01
1	0,7	8,4	565,58	1,36E+03	7,73E-01
1	0,8	8,4	565,58	1,35E+03	8,81E-01
2	0,9	12,8	241,60	1,56E+03	4,46E-01
2	0,9	12,8	241,60	1,57E+03	4,37E-01
2	0,9	12,8	241,60	1,57E+03	4,36E-01
2	0,9	12,8	241,60	1,57E+03	4,45E-01
2	0,9	12,8	241,60	1,56E+03	4,39E-01
2	0,8	12,0	302,00	1,51E+03	5,12E-01
2	0,8	12,0	302,00	1,51E+03	4,71E-01
2	0,8	11,9	302,00	1,49E+03	4,94E-01

2	0,8	11,9	302,00	1,48E+03	4,62E-01
2	0,8	12,0	302,00	1,51E+03	4,89E-01
2	0,7	10,9	362,40	1,50E+03	5,17E-01
2	0,7	10,9	362,40	1,51E+03	5,35E-01
2	0,7	10,9	362,40	1,51E+03	5,01E-01
2	0,7	11,0	362,40	1,52E+03	5,28E-01
2	0,7	11,0	362,40	1,51E+03	5,12E-01
2	1,3	9,8	422,86	1,40E+03	1,13E+00
2	1,1	9,9	422,86	1,43E+03	9,01E-01
2	1,2	9,9	422,86	1,42E+03	9,87E-01
2	1,0	9,9	422,86	1,43E+03	8,35E-01
2	0,9	9,9	422,86	1,41E+03	7,96E-01
2	0,6	8,9	483,34	1,32E+03	5,70E-01
2	0,6	8,9	483,34	1,31E+03	6,08E-01
2	0,6	9,0	483,34	1,33E+03	5,71E-01
2	0,6	9,0	483,34	1,33E+03	5,75E-01
2	0,6	9,0	483,34	1,32E+03	5,60E-01
2	0,6	7,5	565,58	1,04E+03	6,30E-01
2	0,6	7,5	565,58	1,04E+03	6,63E-01
2	0,4	7,5	565,58	1,05E+03	4,94E-01
2	0,6	7,5	565,58	1,04E+03	6,24E-01
2	0,6	7,5	565,58	1,04E+03	6,96E-01
3	1,0	9,5	241,60	8,57E+02	4,67E-01
3	1,0	9,5	241,60	8,64E+02	4,72E-01
3	1,0	9,3	302,00	8,34E+02	5,98E-01
3	0,9	9,3	302,00	8,13E+02	5,54E-01
3	0,9	9,3	302,00	8,20E+02	5,57E-01
3	0,8	8,4	302,00	6,39E+02	5,10E-01
3	0,8	8,4	302,00	6,40E+02	5,03E-01
3	0,8	7,7	362,40	6,49E+02	5,54E-01
3	0,8	7,8	362,40	6,52E+02	5,47E-01
3	0,8	7,7	362,40	6,51E+02	5,59E-01
3	0,8	7,7	362,40	6,51E+02	5,69E-01
3	0,7	7,0	422,86	6,16E+02	6,17E-01
3	0,8	7,0	422,86	6,12E+02	6,40E-01
3	0,7	7,0	422,86	6,06E+02	6,12E-01
3	0,7	7,0	422,86	6,06E+02	6,05E-01
3	0,7	7,0	422,86	6,11E+02	6,12E-01
3	0,6	6,3	483,34	5,41E+02	6,21E-01
3	0,6	6,3	483,34	5,41E+02	6,16E-01
3	0,7	6,3	483,34	5,43E+02	6,31E-01
3	0,6	6,3	483,34	5,41E+02	6,22E-01
3	0,6	6,3	483,34	5,38E+02	6,12E-01
3	0,6	5,2	565,58	4,02E+02	6,53E-01
3	0,6	5,2	565,58	4,01E+02	6,63E-01

3	0,5	5,2	565,58	3,99E+02	6,12E-01
3	0,6	5,2	565,58	4,04E+02	6,36E-01
3	0,6	5,3	565,58	4,09E+02	6,48E-01
4	0,8	12,6	241,60	1,50E+03	3,86E-01
4	0,9	12,6	241,60	1,50E+03	4,59E-01
4	1,2	12,6	241,60	1,52E+03	5,96E-01
4	1,0	12,6	241,60	1,51E+03	4,65E-01
4	1,0	12,6	241,60	1,51E+03	4,99E-01
4	1,1	11,8	302,00	1,45E+03	6,54E-01
4	1,1	11,9	302,00	1,47E+03	6,59E-01
4	1,1	11,9	302,00	1,47E+03	6,84E-01
4	1,2	11,9	302,00	1,47E+03	7,06E-01
4	1,0	11,9	302,00	1,49E+03	6,21E-01
4	0,8	10,6	362,40	1,39E+03	5,99E-01
4	0,8	10,5	362,40	1,38E+03	5,89E-01
4	0,8	10,6	362,40	1,39E+03	5,92E-01
4	0,8	10,6	362,40	1,41E+03	5,82E-01
4	0,8	10,6	362,40	1,40E+03	5,64E-01
4	0,8	9,6	422,86	1,32E+03	6,35E-01
4	0,7	9,6	422,86	1,33E+03	6,07E-01
4	0,7	9,6	422,86	1,34E+03	6,08E-01
4	0,7	9,6	422,86	1,33E+03	5,70E-01
4	0,8	9,6	422,86	1,34E+03	6,38E-01
4	0,7	8,6	483,34	1,21E+03	6,70E-01
4	0,7	8,6	483,34	1,20E+03	6,29E-01
4	0,7	8,6	483,34	1,21E+03	6,31E-01
4	0,7	8,5	483,34	1,18E+03	6,36E-01
4	0,7	8,6	483,34	1,21E+03	6,66E-01
4	0,8	7,3	565,58	9,79E+02	9,21E-01
4	0,8	7,2	565,58	9,53E+02	8,63E-01
4	0,8	7,2	565,58	9,58E+02	8,63E-01
4	0,7	7,2	565,58	9,65E+02	8,26E-01
4	0,7	7,3	565,58	9,68E+02	8,41E-01
5	1,0	11,0	241,60	1,14E+03	5,07E-01
5	1,0	11,0	241,60	1,15E+03	4,95E-01
5	1,0	11,0	241,60	1,15E+03	4,86E-01
5	1,0	11,0	241,60	1,15E+03	4,92E-01
5	1,0	11,0	241,60	1,15E+03	4,83E-01
5	1,3	10,5	302,00	1,12E+03	7,55E-01
5	1,1	10,6	302,00	1,12E+03	6,78E-01
5	1,2	10,5	302,00	1,12E+03	7,35E-01
5	1,1	10,6	302,00	1,13E+03	6,46E-01
5	1,2	10,6	302,00	1,12E+03	7,13E-01
5	0,9	9,3	362,40	1,03E+03	6,38E-01
5	0,9	9,3	362,40	1,04E+03	6,22E-01

5	0,9	9,4	362,40	1,04E+03	6,26E-01
5	0,9	9,3	362,40	1,04E+03	6,29E-01
5	0,9	9,4	362,40	1,05E+03	6,78E-01
5	0,8	8,5	422,86	1,00E+03	6,88E-01
5	0,8	8,5	422,86	1,01E+03	6,67E-01
5	0,8	8,5	422,86	9,93E+02	6,81E-01
5	0,8	8,5	422,86	1,00E+03	6,66E-01
5	0,8	8,5	422,86	1,01E+03	6,73E-01
5	0,7	7,6	483,34	8,99E+02	6,99E-01
5	0,7	7,7	483,34	9,18E+02	7,05E-01
5	0,7	7,6	483,34	9,03E+02	6,92E-01
5	0,7	7,6	483,34	9,03E+02	6,92E-01
5	0,7	7,6	483,34	9,04E+02	6,59E-01
5	0,6	6,4	565,58	7,15E+02	7,35E-01
5	0,6	6,4	565,58	7,13E+02	7,17E-01
5	0,6	6,4	565,58	7,21E+02	7,27E-01
5	0,6	6,4	565,58	7,21E+02	6,98E-01
5	0,6	6,5	565,58	7,23E+02	7,14E-01

Tabulka 12: Výsledky měření 2. série

9.2 Přehled publikovaných prací

1. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.; Skálová, S.: *Serum homocysteine levels in children and adolescents with impaired bone health*. Brazilian Journal of Rheumatology - Revista Brasileira de Reumatologia. Sao Paulo: Elsevier Science, 2013;53: accepted (in print)
2. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.; Němec, V.; Bočkayová, E.: *Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study*. Osteologický builletin, Praha: Trios, 2012; 17:65-68
3. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.: Denosumab a léčba osteoporózy – nové poznatky. Klimakterická medicína, Praha, 2013; 18:5-8
4. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.: Denosumab – významný pokrok v léčbě osteoporózy. Klimakterická medicína, Praha, 2012; 17:5-7
5. Kutílek, Š.; Řeháčková, P.: Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost. Praha: Remedia, 2013; 23:200-204
6. Ďoubal, S.; Kuchařová, M.; Řeháčková, P.; Hradecká, A.: Modern methods of characterization of mechanical properties of viscoelastic bodies and mechanical matching of artificial and biological materials. Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae, Praha, 2013 přijato (v tisku)

9.2.1 Serum homocysteine levels in children and adolescents with impaired bone health

Running Title: Homocysteine and Bone Health in Children

Conflict of Interest: None

ABSTRACT

Introduction: Association between high serum homocysteine (S-Hcy) levels and low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk in postmenopausal women has been documented. Data concerning S-Hcy and bone health in children are scarce. **Objective:** Our aim was to evaluate S-Hcy in children and adolescents with impaired bone health and look for correlations with clinical and laboratory data.

Patients, Methods: We assessed S-Hcy levels in 37 children and adolescents (22 boys and 15 girls; mean age 13.9 ± 3.5 years) with prevalent low-energy trauma fractures (mean 3.3 ± 2.3 per patient) and/or low spinal L1-L4 BMD (below $-2SD$ Z-score; DXA Lunar GE). We also evaluated S-ALP, serum CrossLaps, osteocalcin (S-OC), body height, weight, body mass index (BMI) and serum levels of folate and vitamin B12. At the time of assessment, the children were not taking any drugs known to influence bone metabolism. The age-dependent parameters were expressed as Z-scores \pm SD. **Results:** S-Hcy Z-score was significantly higher (1.3 ± 1.5 ; $p < 0.0001$) and L1-L4 BMD Z-score was significantly lower (-1.7 ± 1.3 ; $p < 0.0001$), respectively, in comparison with reference values. S-ALP did not differ from reference values ($p = 0.88$), while S-CrossLaps and S-osteocalcin were higher (1.2 ± 1.8 and 0.4 ± 0.5 ; $p = 0.0001$ and $p = 0.001$, respectively). S-Hcy was inversely correlated to L1-L4 BMD ($r = -0.33$; $p = 0.05$) and S-ALP ($r = -0.36$; $p = 0.04$) and not related to number of prevalent fractures ($r = 0.01$), S-osteocalcin ($r = -0.22$) or S-CrossLaps ($r = 0.003$). **Conclusion:** These results suggest increased bone turnover and negative influence of elevated S-Hcy on bone formation and BMD in children and adolescents with recurrent fractures.

Keywords: homocysteine; bone mineral density; bone turnover markers; fractures

Introduction: Homocysteine is an amino acid which is biosynthesized from methionine by the removal of its terminal C methyl group. Furthermore, homocysteine can be recycled into methionine or converted into cysteine. The homocysteine metabolism is dependent on vitamin B6, B9, B12 status and also on serum folate concentration.^{1,2} High

serum homocysteine level (S-Hcy) is associated with alterations in vascular morphology, loss of endothelial anti-thrombotic function, and induction of a procoagulant environment, and has been linked to cardiovascular and neurodegenerative disease, diabetes, thrombosis, Raynaud's phenomenon.²⁻⁴

Associations between high S-Hcy levels and low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk in postmenopausal women have been repeatedly documented.⁵⁻¹³ To date, there are scarce data concerning S-Hcy and bone health in children and adolescents. In our recent pilot study involving 19 children (12 boys and 7 girls; mean age 14.9 ± 3.3 years) with recurrent fractures and low BMD, we observed elevated S-Hcy (Table 1) with high inverse and significant correlations between S-Hcy and BMD ($r = -0.66$; $p = 0.01$) and S-Hcy and serum alkaline phosphatase activity (S-ALP) ($r = -0.56$; $p = 0.03$), respectively.¹⁴ S-Hcy was not related to number of prevalent fractures ($r = 0.11$) or S-CrossLaps ($r = -0.14$).¹⁴

Therefore, we further analysed S-Hcy levels together with indices of bone turnover and several clinical and biochemical parameters in a group of 37 children and adolescents with low BMD and/or prevalent low-energy trauma fractures.

Patients, Materials, Methods:

Patients:

We evaluated the charts of children and adolescents who attended our Pediatric Bone Clinic at The Department of Pediatrics in Pardubice in the years 2006-2012. The inclusion criteria were: (i) age between five and 19 years; (ii) at least two prevalent low-energy trauma fractures in personal history; or (iii) low spinal L1-L4 BMD (below -2 SD Z-score); or (iv) combination of both. Four children with less than two prevalent fractures and low BMD were included. In these four children, the BMD measurement was performed due to the following reasons: In one boy with no prevalent fracture, the BMD measurement was performed due to presence of bone fragility risk factors (life-long immobilisation after intracranial hemorrhage); in two girls without fractures, BMD was measured due to estimation of low bone density on the X-ray of the extremities performed by a surgeon after soft tissue injuries; and in one girl due to presence of one low-energy trauma femoral fracture. The subjects were not eligible for evaluation if they were taking any drugs known to influence bone metabolism (alfacalcidol, calcitriol, dihydroxycholesterol, bisphosphonates, glucocorticosteroids, anabolic steroids, antiepileptics, thiazides,

furosemide, thyroid hormones, growth hormone, heparin, warfarin) at the time of the assessment or any time before. The subjects with diabetes mellitus, celiac disease, inflammatory bowel disease, autoimmune disorders, Cushing syndrome, chronic renal failure, hypercalciuria, urolithiasis, hyper- and hypothyroidism, hyper- and hypoparathyroidism were also excluded. All subjects were on a standard central European diet, consisting mostly of meat and carbohydrates. None was on a diet poor in vitamin B, nor was receiving doses of vitamin B exceeding recommended daily allowances. One obese boy was treated for hypertension with enalapril. Others were normotensive. Therefore, we included 37 children and adolescents (22 boys and 15 girls; age range 7-20 years; mean age 13.9 ± 3.5 years).

Procedures:

We evaluated the following data in all 37 patients: S-HCy, markers of bone formation: total S-ALP and serum osteocalcin (S-OC), marker of bone resorption serum Crosslaps, serum calcium (S-Ca), serum phosphate (S-P), serum levels of folate and vitamin B12, body height, weight, body mass index (BMI), L1-L4 spinal BMD. S-cholesterol was also evaluated. The biochemical parameters were assessed from a single morning blood draw in fasting patients.

Materials, Methods:

Body height was measured on the day of the relevant blood draw to the nearest ± 0.5 cm on a calibrated stadiometer.

Body weight was measured on the same day on a calibrated scale to ± 0.5 kg.

The body mass index (BMI) was calculated using the equation:

$$\text{BMI} = \text{weight (kg)} / \text{height}^2 \text{ (m)}.$$

BMD was measured at spine (L1-L4) with dual energy X-ray absorptiometry (DXA) Lunar GE at the day of the blood draw. Measurement precision, expressed as coefficient of variation, was 1.0%.

S-homocysteine level was evaluated by chemiluminescence (Immulite 2500 immunoassay system, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany) and expressed in $\mu\text{mol/L}$. The interassay variation was 2.06% in samples with S-Hcy concentration $7.43 \mu\text{mol/L}$; 1.99% with S-Hcy $10.31 \mu\text{mol/L}$, and 1.72% with S-Hcy $22.25 \mu\text{mol/L}$, respectively. Serum calcium (S-Ca) and S-P were assessed by colorimetric assay and

expressed in mmol/L. Serum alkaline phosphatase activity (S-ALP) was measured by colorimetric assay and expressed in $\mu\text{kat/L}$.

Serum CrossLaps and S-OC were assessed by means of electrochemiluminescence immunoassay – ECLIA on Elecsys-Cobas analyzers and expressed in ng/L and ng/mL, respectively.

Serum folic acid and serum vitamin B12 (S-B12) were assessed by chemiluminiscence on Access analyzer (Beckman Coulter) and expressed in $\mu\text{g/L}$ and ng/L, respectively.

Statistics:

To eliminate the influence of age, the obtained results of body height, weight, BMI, S-HCy, S-ALP, S-CrossLaps, S-OC were calculated as standard deviation scores (SDS) or Z-scores by the equation $\text{SDS} = (\text{actual individual value} - \text{mean value for age and sex}) / \text{standard deviation for age and sex}$. The BMD reference data (concerning European paediatric population) were supplied by the manufacturer within the DXA software package. Previously published results, served as reference data: Czech anthropometric parameters from a 2001 survey,¹⁵ previously obtained HCy values of healthy Czech paediatric population,¹⁶ S-ALP values of Czech children,¹⁷ S-CTx levels of healthy British population.¹⁸ The normal S-OC range was determined in 77 children aged 7 - 19 years without evidence of bone, hepatic, renal, gastrointestinal or endocrine disorders. For statistical analysis, Sigmaplot 2.0 and Systat programme was used. The statistical analysis was performed by unpaired *t*-test. The linear regression analysis was performed to compare the relationship among respective parameters. For all results, $p < 0.05$ was required for statistical significance.

Results:

The mean number of prevalent low-energy trauma fractures was 3.3 ± 2.3 (SD) per patient. The mean S-homocysteine level was $10.7 \mu\text{mol/L} \pm 2.9$ SD; range 6.7- 20 $\mu\text{mol/L}$. There was a significant positive correlation with age ($r = 0.47$, $p < 0.01$) (Figure 1).

7 patients (19%) had S-homocysteine level above +2SD, 30 patients (81%) had S-homocysteine levels in the range of ± 2 SD.

When converted to Z-scores and compared with reference values, the S-Hcy Z-score was significantly higher and L1-L4 BMD Z-score was significantly lower, respectively, in

comparison with reference values. S-ALP Z-score did not differ from reference values, while S-CrossLaps were higher, same as S-OC (Table 2).

The mean levels of S-folate and B12 were $7.5 \mu\text{g/L} \pm 4.2 \text{ SD}$ and $413 \text{ ng/L} \pm 143 \text{ SD}$, which fall within normal reference ranges of $2.3 - 17 \mu\text{g/L}$ and $180 - 914 \text{ ng/L}$, respectively.

S-Ca and S-P levels were within normal reference range (mean \pm SD: $2.33 \pm 0.10 \text{ mmol/L}$; range $2.13 - 2.54$; and $1.45 \pm 0.23 \text{ mmol/L}$; range $0.78 - 1.99$, respectively). Mean S-cholesterol level was $4.21 \pm 0.96 \text{ mmol/L}$ (range $3.06 - 5.59 \text{ mmol/L}$), therefore within the normal reference range of $2.7 - 5.6 \text{ mmol/L}$.

Mean body height, body weight, and BMI Z-score did not differ from reference values (Table 2), however in five subjects the BMI Z-score exceeded $+2\text{SD}$. The body height, weight and BMI Z-scores positively correlated with L1-L4 BMD Z-score ($r = 0.44$, 0.53 and 0.50 , respectively; $p = 0.02$).

S-Hcy was inversely correlated to L1-L4 BMD (Figure 2) and S-ALP (Figure 3), respectively, and not related to number of prevalent fractures ($r = 0.11$), S-osteocalcin ($r = -0.22$) or S-CrossLaps ($r = 0.003$).

There was significant inverse correlation between S-Hcy and vitamin B12 ($r = -0.36$, $p = 0.05$) and no correlation between S-Hcy and serum level of folic acid ($r = 0.05$).

Furthermore, we found positive correlations between S-osteocalcin and S-CTx ($r = 0.36$, $p = 0.05$), S-ALP and S-OC ($r = 0.58$, $p = 0.01$), and S-CTx and S-ALP ($r = 0.39$, $p = 0.05$), respectively.

Discussion:

In our previous pilot study of 19 children with prevalent fractures and low BMD, the obtained results suggested negative influence of elevated S-Hcy on bone formation and BMD, while bone resorption was increased in this group of pediatric patients.¹⁴ In an expanded group of 37 children with impaired bone status, we obtained very similar results. S-Hcy was elevated and inversely correlated with S-ALP and BMD. Furthermore, we found indices of increased bone turnover in our patients, as S-OC and S-Crosslaps were elevated in comparison to the reference data, and there were positive mutual correlations among the bone turnover markers. The low BMD in our patients was not influenced by stunted growth, as the body height did not differ from reference value, however our results

confirm dependence of BMD on basic anthropometric parameters. As there is a proven association between low bone density and fractures in children,^{19,20} hyperhomocysteinemia might represent an important risk factor for children's bone health. Furthermore, in adults, an association between high S-Hcy and low BMD was reported by several authors,^{6,11} same as high S-Hcy in osteoporotic postmenopausal women with no relationship to BMD values.⁷ In addition, further research revealed that high homocysteine levels are associated with an increased risk of hip fracture in elderly population.¹⁰

From the pathophysiological point of view, osteoporosis and higher fracture risk in patients with high S-Hcy is currently explained by accumulation of homocysteine in bone, resulting in a distinct reduction of cancellous bone and a drop in bone strength.⁹ Furthermore, homocysteine stimulates osteoclast activity.²¹ A reduced methylation capacity of bone cells might contribute as well.²²

As we did not find any relationship between the number of prevalent fractures and S-Hcy in our patient group, we may hypothesize that the study was not powered enough to detect significant relationship between these two parameters. Concerning the cardiovascular risk factors, the S-cholesterol and BMI were not significantly elevated in our patients, and only one subject was hypertensive.

Anyway, our results further confirm the negative effect of elevated S-Hcy on bone health even in pediatric population. The developmental aspects of various disease states of the elderly (i.e. osteoporosis, high blood pressure, hypercholesterolemia, obesity) are currently being given special attention, as these disorders usually originate in childhood. It seems likely that the effect of homocysteine on bone quality is this case as well.

Conclusion:

Our results further suggest that elevated S-Hcy could be a risk factor of impaired bone health in children and adolescents.

Figure 1

S- homocysteine ($\mu\text{mol/L}$) vs. age (years)

$R = 0.47, p < 0.01$

S- homocysteine

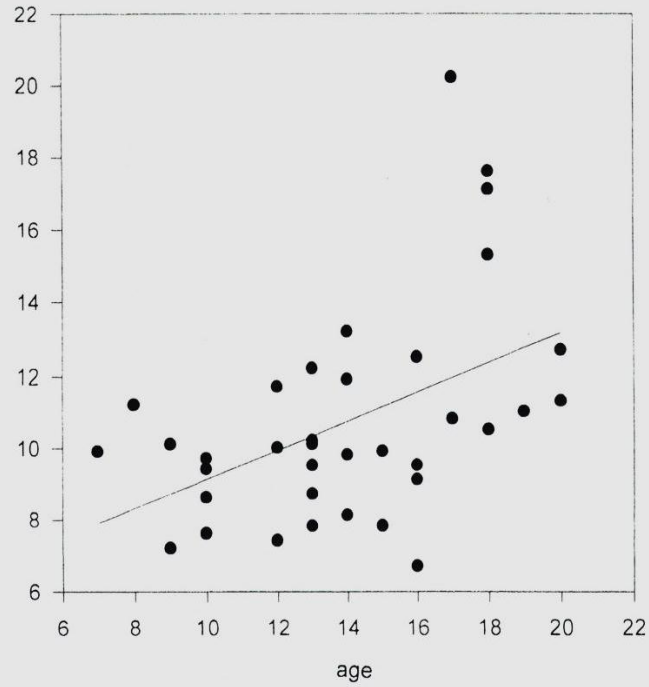
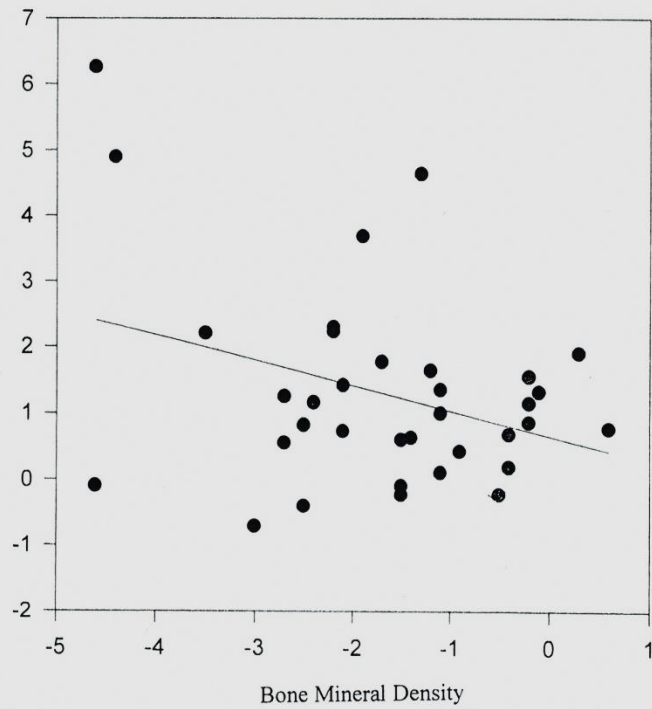


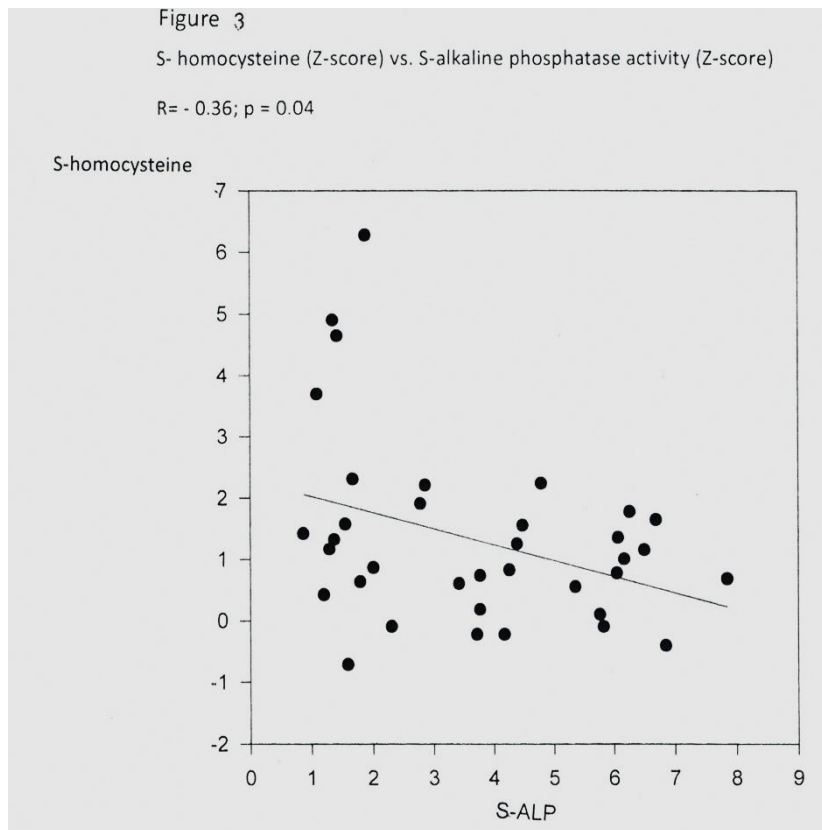
Figure 2

S- homocysteine (Z-score) vs. Bone Mineral Density (Z-score)

$R = -0.33; p = 0.05$

S-homocysteine





References

- 1) Rauh M, Verwied S, Knerr I, Dörr HG, Sönnichsen A, Koletzko B. Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. *Amino Acids*. 2001;20:409-18.
- 2) Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M; DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): Consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1392-1403.
- 3) Riddell LJ, Chisholm A, Duncan A, Mann JI. Homocysteine levels in healthy New Zealanders and those with vascular disease. *N Z Med J*. 1999;112:438-42.
- 4) Kutilek S, Nemeč V, Bockayová E. Elevated serum homocysteine levels in paediatric patients with primary Raynaud's phenomenon. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:125-30
- 5) Bozkurt N, Erdem M, Yılmaz E, Erdem A, Biri A, Kubatova A, Bozkurt M. The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280:381-7.
- 6) Bucciarelli P, Martini G, Martinelli I, Ceccarelli E, Gennari L, Bader R, Valenti R, Franci B, Nuti R, Mannucci PM. The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in postmenopausal women. *Eur J Intern Med*. 2010 ;21:301-5.

- 7) Haliloglu B, Aksungar FB, Ilter E, Peker H, Akin FT, Mutlu N, Ozekici U. Relationship between bone mineral density, bone turnover markers and homocysteine, folate and vitamin B12 levels in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281:663-8.
- 8) Krivosíková Z, Krajčovicová-Kudláčková M, Spustová V, Stefiková K, Valachovicová M, Blazíček P, Němcová T. The association between high plasma homocysteine levels and lower bone mineral density in Slovak women: the impact of vegetarian diet. *Eur J Nutr.* 2010 ;49:147-53.
- 9) Levasseur R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine.* 2009 ;76:234-40.
- 10) Leboff MS, Narweker R, LaCroix A, Wu L, Jackson R, Lee J, Bauer DC, Cauley J, Kooperberg C, Lewis C, Thomas AM, Cummings S. Homocysteine levels and risk of hip fracture in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1207-13.
- 11) Ouzzif Z, Oumghar K, Sbai K, Mounach A, Derouiche EM, El Maghraoui A. Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal women. *Rheumatol Int.* 2010;32:123-8.
- 12) Shiraki M, Kuroda T, Shiraki Y, Tanaka S, Higuchi T, Saito M. Urinary pentosidine and plasma homocysteine levels at baseline predict future fractures in osteoporosis patients under bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab.* 2011;29:62-70.
- 13) Yilmaz N Eren E. Homocysteine oxidative stress and relation to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis. *Aging Clin Exp Res.* 2009;21:353-7.
- 14) Kutilek S, Rehackova P, Nemeč V, Bockayová E. Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study. *Osteol Bull* 2012;17:65-8.
- 15) Kobzova J, Vignerova J, Blaha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Publ Health* 2004; 12 : 126–30
- 16) Nemeč V, Bockayova E, Kutilek Š. Serum homocysteine levels in Czech children and adolescents. *Acta Medica* 2012;55: 87-90.
- 17) Kutilek S, Bayer M. Total serum alkaline phosphatase activity and its relationship to age and growth in children. *Osteol Bull* 2003;8:52-5.
- 18) Crofton PM, Evans N, Taylor MRH, Holland CV. Serum CrossLaps: Pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002;48, 671-3
- 19) Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, Tobias JH. Association between bone mass and fractures in children: A prospective cohort study. *J Bone Miner Res* 2006;21:1489-95
- 20) Clark EM, Tobias JH, Ness AR. Association between bone density and fractures in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics.* 2006;117:291-7.
- 21) Vaes BL, Lute C, Blom HJ, Bravenboer N, de Vries TJ, Everts V, Dhonukshe-Rutten RA, Müller M, de Groot LC, Steegenga WT. Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid. *Calcif Tissue Int.* 2009;84:413-22.
- 22) Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, Taban-Shomal O, Umanskaya N, Ross S, Garcia P, Hübner U, Herrmann W. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone.* 2009;44:467-75.

9.2.2 Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study

PŮVODNÍ PRÁCE

Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study

Š. KUTÍLEK¹, P. ŘEHÁČKOVÁ², V. NĚMEC¹, E. BOČKAYOVÁ¹

¹Department of Pediatrics, Pardubice Hospital and Faculty of Health Studies, University of Pardubice, Czech Republic, ²CCBR – Center for Clinical and Basic Research, Pardubice, Czech Republic

SOUHRN

Kutílek Š., Řeháčková P., Němec V., Bočková E.

Klíčová slova:

SUMMARY

Kutílek Š., Řeháčková P., Němec V., Bočková E.: Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study

Background: High serum homocysteine (S-Hcy) levels are associated with low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk in postmenopausal women. So far, data on S-Hcy and bone health are lacking in children and adolescents.

Patients, Methods: We assessed S-Hcy levels in 19 children and adolescents (12 boys and 7 girls; mean age 14.9 ± 3.3 years) with prevalent low-energy trauma fractures (mean 4 ± 2.6 per patient) and/or low spinal L1-L4 BMD (below -2SD Z-score; DXA Lunar GE). Other assessments included serum alkaline phosphatase (S-ALP) and serum CrossLaps. At the time of assessment, the children were not taking any drugs known to influence bone metabolism. To eliminate the influence of age, the obtained results were expressed as Z-scores ± SD.

Results: S-Hcy Z-score was significantly higher (1.4 ± 1.8; p = 0.001) and L1-L4 BMD Z-score was significantly lower (-2.1 ± 1.3; p = 0.0001), respectively, in comparison with reference values. S-ALP did not differ from reference values (p = 0.91), while S-CrossLaps were higher (1.5 ± 1.9; p = 0.001). S-Hcy was inversely correlated to L1-L4 BMD (r = -0.66; p = 0.01) and S-ALP (r = -0.56; p = 0.03) and not related to number of prevalent fractures (r = 0.11) or S-CrossLaps (r = -0.14). These results suggest negative influence of elevated S-Hcy on bone formation and BMD in children with fractures, while bone resorption was increased in this group of pediatric patients. In conclusion, our results suggest that elevated S-Hcy is a risk factor of impaired bone health in children and adolescents. Further studies are necessary for more detailed clarification of these issues.

Keywords: homocystetne, bone mineral density, fractures, bone turnover markers

Address: Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc., Department of Pediatrics, Pardubice Hospital and Faculty of Health Studies, University of Pardubice, Czech Republic, e-mail: stepan.kutilek@nemocnice-pardubice.cz

Osteologický bulletin 2012;17(2):65–68

Došlo do redakce: 10. 7. 2012

Přijato k tisku: 27. 7. 2012

Introduction

Homocysteine, an amino acid homologous to cysteine, is biosynthesized from methionine by the removal of its terminal C methyl group. Homocysteine can be recycled into

methionine or converted into cysteine. Deficiencies of the vitamins B6, B9 and B12 impair such conversion and can lead to high serum homocysteine concentration [1,2]. The serum homocysteine level (S-Hcy) is inversely correlated

with serum folate concentration in children and adults [1]. High S-homocysteine has been linked to cardiovascular and neurodegenerative disease, diabetes, thrombosis [2,3]. Hyperhomocysteinemia is associated with alterations in vascular morphology, loss of endothelial anti-thrombotic function, and induction of a procoagulant environment [2]. High serum homocysteine (S-Hcy) levels are also associated with low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk in postmenopausal women and also in experimental animals (4-15). So far there are no complex data on S-Hcy and bone health in children and adolescents. Our aim was to evaluate S-Hcy levels in children with low BMD and/or prevalent low-energy trauma fractures in a retrospective pilot study.

Patients, Materials, Methods

Patients:

The charts of 19 children and adolescents (12 boys and 7 girls; mean age 14.9 ± 3.3 years) attending our Pediatric Bone Clinic were retrospectively evaluated. The inclusion criteria for this pilot study were at least two prevalent low-energy trauma fractures in personal history and/or low spinal L1-L4 BMD (below -2 SD Z-score). The mean number of prevalent fractures was 4.0 ± 2.6 (SD) per patient. The diagnostic distribution of the patients was: osteogenesis imperfecta ($n = 3$) and inadequately low bone density/osteoporosis of unknown origin ($n = 16$). At the time of the assessment, the patients were not taking any drugs known to influence bone metabolism. All subjects were on a standard central European diet, consisting mostly of meat and carbohydrates. None was on a diet poor in vitamin B, nor was re-

ceiving doses of vitamin B exceeding recommended daily allowances.

Materials:

The following biochemical parameters were assessed from a single morning blood draw in fasting patients: Serum levels of homocysteine, calcium, phosphate, blood urea nitrogen, creatinin, CrossLaps, serum activity of alkaline phosphatase.

Methods:

BMD was measured at spine (L1-L4) with dual energy X-ray absorptiometry (DXA) Lunar GE at the day of the blood draw. Measurement precision, expressed as coefficient of variation, was 1.0 %.

S-homocysteine level was evaluated by chemiluminescence (Immulite 2500 immunoassay system, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany) and expressed in mol/L. The interassay variation was 2.06 % in samples with S-homocysteine concentration $7.43 \mu\text{mol/L}$; 1.99 % with S-homocysteine $10.31 \mu\text{mol/L}$, and 1.72 % with S-homocysteine $22.25 \mu\text{mol/L}$, respectively.

Serum calcium (S-Ca) and serum phosphate (S-P) were assessed by colorimetric assay and expressed in mmol/L. Serum alkaline phosphatase activity (S-ALP) was measured by colorimetric assay and expressed in $\mu\text{kat/L}$. Serum CrossLaps (S-CTx) were assessed by means of electrochemiluminescence immunoassay – ECLIA on Elecsys-Cobas analyzers and expressed in ng/L.

Body height was measured on the day of the relevant blood draw to the nearest ± 0.5 cm on a calibrated stadiometer.

Figure 1
S-Homocysteine (Z-Score) VS BMD (Z-Score)
 $R = -0.66$; $P = 0.01$
S-Homocysteine, Y Axis
BMD, X Axis

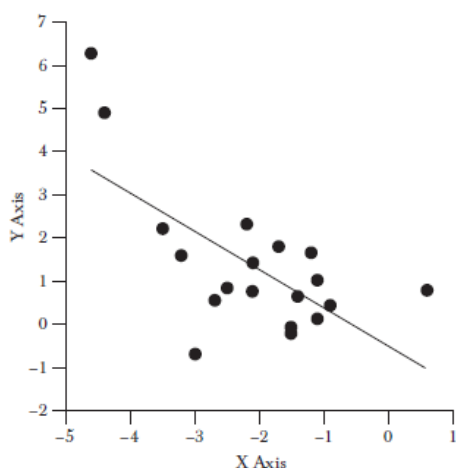
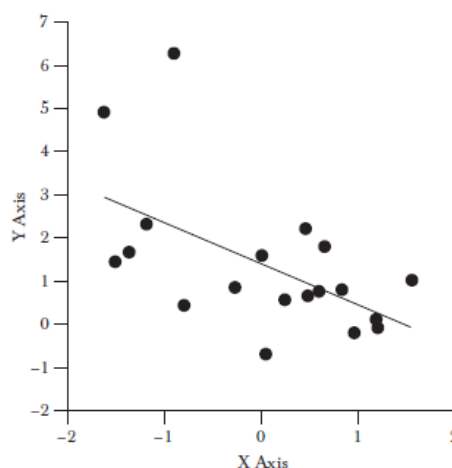


Figure 2
Homocysteine (Z-Score) VS S-ALP (Z-Score)
 $R = -0.56$; $P = 0.03$
S-Homocysteine, Y Axis
S-ALP, X Axis



To eliminate the influence of age, the obtained results of body height, S-Hcy, S-ALP, S-CTX were calculated as standard deviation scores (SDS) or Z-scores by the equation $SDS = (\text{actual individual value} - \text{mean value for age and sex}) / \text{standard deviation for age and sex}$. The BMD reference data (concerning European paediatric population) were supplied by the manufacturer within the DXA software package. The following, previously published values, served as reference data: Czech anthropometric parameters from a 2001 survey [16], previously obtained Hcy values of healthy Czech paediatric population [17], S-ALP values of Czech children [18] and S-CTX levels of healthy British population [19]. For statistical analysis, Sigmaplot 2.0 and Systat programme was used. The statistical analysis was performed by unpaired t-test. The linear regression analysis was performed to compare the relationship among respective parameters. For all results, $p < 0.05$ was required for statistical significance.

Results:

The mean S-Hcy was $10.9 \text{ mol/L} \pm 3.4 \text{ (SD)}$. The mean L1-L4 BMD was $0.818 \text{ g/cm}^2 \pm 0.138 \text{ (SD)}$. The mean S-ALP value was $3.6 \text{ } \mu\text{kat/L} \pm 2.1 \text{ (SD)}$ and mean S-Crosslaps value was $925 \text{ ng/L} \pm 522 \text{ (SD)}$. When converted to Z-scores and compared with reference values, the S-Hcy Z-score was significantly higher and L1-L4 BMD Z-score was significantly lower, respectively, in comparison with reference values (Table 1). S-ALP Z-score did not differ from reference values, while S-CrossLaps were higher (Table 1). S-Ca and S-P levels were within normal reference range (mean \pm SD: $2.36 \pm 0.09 \text{ mmol/L}$; range 2.18–2.54; and $1.52 \pm 0.19 \text{ mmol/L}$; range 1.16–1.99, respectively). Mean body height Z-score was -0.06 ± 1.04 which did not differ from reference values (Table 1). There was no correlation between body height and BMD Z-scores ($r = -0.004$). S-Hcy was inversely correlated to L1-L4 BMD ($r = -0.66$; $p = 0.01$) (Figure 1) and S-ALP (Figure 2) ($r = -0.56$; $p = 0.03$) and not related to number of prevalent fractures ($r = 0.11$) or S-CrossLaps ($r = -0.14$).

Discussion:

Our results suggest negative influence of elevated S-Hcy on bone formation and BMD in children with fractures, while bone resorption was increased in this group of pediatric patients. The low BMD in our patients was not influenced by body height, as the body height did not differ from reference values and was there was no correlation between BMD and body height.

In adult patients, a negative relationship between S-Hcy and BMD has been reported by several authors [4,5]. Another study revealed high S-Hcy in osteoporotic postmenopausal women with no relationship to BMD values [8]. Yet another study indicated that high homocysteine levels are associated with an increased risk of hip fracture, which could be accounted for by poor renal function [12]. In addition, hyperhomocysteinemia was found to be associated with impaired fracture healing in mice [13].

Osteoporosis and higher fracture risk in patients with high S-Hcy is currently explained by accumulation of homocysteine in bone resulting in a distinct reduction of cancellous

Table 1: Patient data expressed as Z-scores \pm SD

Parameter	Mean	SD	p [†]
S-homocysteine	1.4	1.8	0.001
L1-L4 BMD	-2.1	1.3	0.0001
S-ALP	0.03	1.0	0.91
S-CrossLaps	1.5	1.9	0.001
Height	-0.06	1.0	0.27

BMD – bone mineral density; S-ALP – serum alkaline phosphatase activity

[†]Compared to reference data

bone and a drop in bone strength. Furthermore, homocysteine stimulates osteoclast activity [15]. A reduced methylation capacity of bone cells might be another relevant pathomechanism [14].

We did not find any relationship between number of prevalent fractures and S-Hcy in our patient group. We may hypothesize that due to low number of patients, the study was not powered enough to detect significant relationship between these two parameters, and a more extensive research should be performed. We are aware of other shortcomings, including the fact that methylenetetrahydrofolate reductase levels and vitamin B status were not evaluated in our patients.

Conclusion

Our results suggest that elevated S-Hcy could be a risk factor of impaired bone health in children and adolescents. Further studies are necessary for more detailed clarification of these issues.

References

- Rauh M, Verwied S, Knerr I, Dörr HG, Sönnichsen A, Koletzko B. Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. *Amino Acids* 2001;20:409–418.
- Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): Consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1392–1403.
- Riddell LJ, Chisholm A, Duncan A, Mann JI. Homocysteine levels in healthy New Zealanders and those with vascular disease. *N Z Med J* 1999;112:438–442.
- Bucciarelli P, Martini G, Martinelli I, Ceccarelli E, Gennari L, Bader R, Valenti R, Franci B, Nuti R, Mannucci PM. The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in post-menopausal women. *Eur J Intern Med* 2010;21:301–305.
- Ouzzif Z, Oumghar K, Sbai K, Mounach A, Derouiche EM, Maghraoui A. Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal women. *Rheumatol Int* 2010;32:123–128.
- Yilmaz N, Eren E. Homocysteine oxidative stress and relation to bone mineral density in post-menopausal osteoporosis. *Aging Clin Exp Res* 2009;21:353–357.
- Shiraki M, Shiraki Y, Tanaka S, Higuchi T, Saito M. Urinary pentosidine and plasma homocysteine levels at baseline predict future fractures in osteoporosis patients under bisphosphonate treatment. *Bone Miner Metab* 2011;29:62–70.
- Haliloglu B, Aksungur FB, Ilter E, Peker H, Akin FT, Mutlu N, Ozekici U. Relationship between bone mineral density, bone turnover markers and homocysteine, folate and vitamin B12 levels in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:663–668.
- Krivošíková Z, Krajčovičová-Kudláčková M, Spustová V, Štefková K,

- Valachovicová M, Blažíček P, Němcová T. The association between high plasma homocysteine levels and lower bone mineral density in Slovak women: the impact of vegetarian diet. *Eur J Nutr* 2010;49:147–153.
10. Levasseur R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine* 2009;76:234–240.
 11. Bozkurt N, Erdem M, Yilmaz E, Erdem A, Biri A, Kubatova A, Bozkurt M. The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:381–387.
 12. Leboff MS, Narweker R, LaCroix A, Wu L, Jackson R, Lee J, Bauer DC, Cauley J, Kooperberg C, Lewis C, Thomas AM, Cummings S. Homocysteine levels and risk of hip fracture in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1207–1213.
 13. Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Olkü I, Garcia P, Histing T, Obeid R, Schorr H, Herrmann W, Pohlemann T, Menger MD, Holstein JH. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 2009;85:17–21.
 14. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, Taban Shomal O, Umanskaya N, Ross S, Garcia P, Hübner U, Herrmann W. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 2009;44:467–475.
 15. Vaes BL, Lute C, Blom HJ, Bravenboer N, de Vries TJ, Everts V, Dhonukshe-Rutten RA, Müller M, de Groot LC, Steegenga WT. Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid. *Calcif Tissue Int* 2009;84:413–422.
 16. Kobzová J, Vignerová J, Bláha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Publ Health* 2004;12:126–130.
 17. Němec V, Bočková E, Kutlík Š. Serum homocysteine levels in Czech children and adolescents. *Acta Medica* 2012;55:accepted, in print.
 18. Kutlík Š, Bayer M. Hodnoty celkové aktivity alkalické fosfatázy v séru u dětí v závislosti na věku a růstu (Total serum alkaline phosphatase activity and its relationship to age and growth in children). *Osteol Bull* 2003;8:52–55.
 19. Crofton PM, Evans N, Taylor MRH, Holland CV. Serum CrossLaps: Pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002;48:671–673.

9.2.3 Denosumab a léčba osteoporózy – nové poznatky

Denosumab a léčba osteoporózy – nové poznatky

Š. Kutilek¹, P. Řeháčková²

¹Osteologická ambulance Dětského oddělení
Pardubické krajské nemocnice a.s., Pardubice,
prim. MUDr. M. Šenkeřík

²Center for Clinical and Basic Research (CCBR),
Pardubice, ředitel MUDr. T. Hála

Souhrn

Denosumab je relativně nový přípravek určený k léčbě osteoporózy. Jedná se o plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která se specificky a s vysokou afinitou váže na RANK ligand, čímž zabraňuje formaci osteoklastů, inhibuje jejich funkci a zkracuje jejich přežívání. Zavedení denosumabu do klinické praxe představuje významný předěl v léčbě osteoporózy, neboť denosumab zásadně zlepšuje pevnost kortikální kosti, která má zásadní význam pro integritu skeletu. Existují též zkušenosti týkající se dlouhodobé, šesti – až osmileté, léčby denosumabem.

Klíčová slova: denosumab – denzita kostního minerálu – kortikální kost – fraktury – trvání léčby.

Úvod

Denosumab je přípravek určený k léčbě osteoporózy. Jedná se o plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která má vysokou afinitu k RANKL (Receptor activator of nuclear factor NF-kappa-B ligand), čímž inhibuje diferenciaci osteoklastů, jejich funkci a přežívání. Denosumab je antiresorpční (antikatabolický) přípravek. Antikatabolické přípravky snižují kostní remodelaci, prodlužují životnost kostních strukturálních jednotek, čímž se prodlužuje doba během níž dochází k akumulaci kostního minerálu a tím stoupá kostní mineralizace. Po podání denosumabu dochází k poklesu kostní resorpce, k nárůstu BMD a ke snížení rizika vzniku fraktur obratlových i mimoobratlových [1–10]. Oproti působení bisfosfonátů má denosumab reversibilní účinek na kost, neboť je degradován a není ukládán v organizmu. Zavedení denosumabu představuje významný předěl v léčbě osteoporózy.

Osteoporóza je v současné době považována za jedno z nejvíce invalidizujících a finančně náročných onemocnění v Evropě a Americe. Je všeobecně známo, že v období mezi 20.–80. rokem života ztrácí člověk až polovinu své kostní hmoty, a v této souvislosti byl zmiňován úbytek trámčité tkáně. Relativní ztráta kostní hmoty s věkem je markantnější v trabekulární kosti, protože ta má vyšší poměr povrch/objem. Absolutní úbytek kostní hmoty je však vyšší v kortikální kosti, což významně přispívá k poklesu mechanické odolnosti kostní tkáně [11–14].

Nedávno publikované studie prokazují, že kortikální kost má zásadní význam pro integritu skeletu a pevnost kortikální kosti je rozhodujícím faktorem pro vznik zlomeniny [13]. S přibývajícím věkem dochází k úbytku kortikální

hmoty, zejména v důsledku jejího ztenčení a nárůstu porozity kortikální kosti [13–15]. U postmenopauzálních žen představují mimoobratlové zlomeniny v oblastech skeletu s převahou kortikální kosti 80 % všech zlomenin. U postmenopauzálních žen s vyšší postavou bylo zjištěno zvýšené riziko zlomeniny v důsledku tenčí vrstvy kortikální kosti a zvýšené porozity kortikální tkáně [16]. Denosumab má významný pozitivní vliv zejména na kortikální kost, jak bude ukázáno v následujícím textu.

Klinická hodnocení s denosumabem

Ve dvojitě zaslepené pilotní studii fáze II bylo 247 postmenopauzálních žen randomizováno k léčbě denosumabem (60 mg s.c. každých 6 měsíců), alendronátem (70 mg p.o. týdně) nebo placebem. Morfologické změny v oblasti distálního radia a distální tibia byly po 12 měsících hodnoceny pQCT v oblasti distálního radia. V placebové větvi došlo k poklesu celkové, kortikální a trabekulární denzity kostní minerálu (bone mineral density – BMD) a rovněž tak k ztenčení kortikální kosti v oblasti distálního radia (-2,1 % až -0,8 %). Podávání alendronátu zabránilo poklesu hodnot uvedených parametrů (-0,6 % až 2,4 %; $p = 0,051$ až $< 0,001$ vs. placebo), zatímco denosumab zabránil poklesu, a dokonce vedl k zlepšení sledovaných hodnot (0,3 % až 3,4 %; $p < 0,001$ vs. placebo). Denosumab oproti alendronátu významněji ovlivnil změny celkové a kortikální BMD ($p < 0,024$). Obdobný nálezn byl pozorován v oblasti tibia. Moment setrvačnosti, který vypovídá o mechanické odolnosti tkáně, byl rovněž vyšší po léčbě denosumabem ve srovnání s léčbou alendronátem ($p < 0,001$). Nebyl zjištěn rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků [17].

Dvojitě zaslepená, placeboem kontrolovaná studie fáze III s názvem DEFEND (Denosumab Evaluation for Preserving Bone Density) hodnotila vliv dvouletého podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) na BMD a kostní obrat u 332 postmenopauzálních žen s nízkou BMD. Metodou QCT byly též v oblasti distálního radia hodnoceny změny volumetrické kostní denzity, volumetrický obsah kostního minerálu, tloušťka kortikální kosti, její objem a obvod, a též polární moment setrvačnosti, který je ukazatelem mechanické odolnosti kosti. Denosumab po 24 měsících významně zvýšil BMD v oblasti bederní páteře (6,5 vs. -0,6 %; $p < 0,0001$) a významně zvýšil BMD v kyčli, distálním radiu a též celotělovou BMD. QCT prokázala u pacientek léčených denosumabem oproti placebo zvýšení volumetrické BMD i volumetrického obsahu kostního minerálu kortikální kosti v oblasti distálního radia ($p < 0,001$), nárůst tloušťky kortikální kosti, rovněž tak se zlepšil polární moment setrvačnosti (+6,6 %; $p < 0,0001$). Došlo též ke zlepšení strukturálních parametrů v oblasti kyčle. Ukazatele kostního obratu byly po léčbě denosumabem výrazně sníženy [9,18].

Nejrozsáhlejším a nejvýznamnějším klinickým hodnocením s denosumabem byla dvojitě zaslepená, placeboem kontrolovaná studie FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months) [19], která hodnotila vliv denosumabu na výskyt nových fraktur. Zařazeno bylo 7868 žen. Studii dokončilo 6478 pa-

cientek (82 %). Třileté podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) postmenopauzálním osteoporotickým ženám vedlo v porovnání s placebem k 68% poklesu rizika zlomenin obratlů ($p < 0,0001$) a 20% poklesu rizika mimoobratlových zlomenin ($p = 0,011$), riziko zlomenin kyčle bylo sníženo o 40 % ($p = 0,036$). BMD bederní páteře se po podávání denosumabu zvýšila za tři roky o 9 % a v kyčli představoval tento nárůst 6 % ($p < 0,0001$). Výskyt nežádoucích příhod byl v obou skupinách (denosumab vs. placebo) obdobný. Denosumab tedy jednoznačně snížil riziko vzniku obratlových i mimoobratlových zlomenin při vynikajícím bezpečnostním profilu [19].

V rámci studie FREEDOM bylo též provedeno hodnocení vlivu denosumabu na kostní hustotu a mechanickou odolnost trámčité a kortikální tkáně v oblasti radia [20]. BMD radia, obsah kostního minerálu a polární moment setrvačnosti byly vyšetřeny v prespecifikovaných podstudiiích za použití DXA (placebo, $n = 209$; denosumab, $n = 232$) nebo QCT (placebo, $n = 48$; denosumab, $n = 62$). Prespecifikovaná analýza vyhodnotila výskyt zlomenin zápěstí u všech účastnic studie FREEDOM, zatímco v *post hoc* analýze byly hodnoceny ženy s vyšším rizikem zlomeniny (T-skóre BMD krčku femuru $\leq -2,5$ SD; placebo, $n = 1406$; denosumab, $n = 1384$). Denosumab významně zvýšil BMD (vyhodnoceno metodou DXA) a volumetrickou BMD, obsah kostního minerálu a polární moment setrvačnosti (hodnoceno QCT) v porovnání s placebem v kortikální i trámčité kosti radia ($p < 0,05$). Výskyt zlomeniny zápěstí byl po 36 měsících léčby 2,9 % v placebové skupině a 2,5 % u pacientek léčených denosumabem (pokles relativního rizika o 16 %; $p = 0,21$). U žen s vyšším rizikem zlomeniny (T-skóre BMD krčku femuru $\leq -2,5$ SD) denosumab významně snížil výskyt fraktury zápěstí (placebo – 4,0 %; denosumab – 2,4 %; pokles relativního rizika o 40 %; pokles absolutního rizika o 1,6 %; $p = 0,03$).

Z uvedených výsledků vyplývá, že denosumab oproti placebo významně zlepšuje BMD, množství a kvalitu trámčité a kortikální tkáně v oblasti radia [20]. U žen s vyšším rizikem zlomeniny denosumab snižuje riziko vzniku fraktur zápěstí [20].

Ve studii FREEDOM byla rovněž hodnocena metodou QCT volumetrická BMD v oblasti bederní páteře, kyčle a krčku femuru při vstupním vyšetření a po 12, 24 a 36 měsících [21]. Jednalo se o podskupinu 209 žen. Signifikantní nárůst plošné a volumetrické BMD ve všech hodnocených oblastech byl patrný jak v průběhu času u pacientek léčených denosumabem, tak v porovnání s placebem. Po 36 měsících léčby denosumabem činil rozdíl volumetrické BMD v bederní páteři, kyčli a krčku femuru oproti placebo 21,8 %, 7,8 %, a 5,9 % (vždy $p \leq 0,0001$). V porovnání s placebem byl patrný nárůst obsahu kostního minerálu v kyčli ($p < 0,0001$), který souvisel s významným zvýšením obsahu kostního minerálu v kortikální kosti ($p < 0,0001$). Uvedené výsledky studie FREEDOM dokazují pozitivní účinek denosumabu na kortikální i trámčitou kostní tkáň [21].

V rámci studie FREEDOM byla provedena též podstudie se 441 účastnicemi, v níž byla hodnocena plošná BMD metodou DXA, a to v oblasti bederní páteře, kyčle, krčku femuru, trochanteru a dolní třetiny radia; též byla vyhod-

nocena celotělová denzita. Signifikantní nárůst BMD po podání denosumabu byl patrný již po jednom měsíci v bederní páteři, kyčli a trochanteru. (vždy $p < 0,005$ vs. placebo a vstupní hodnoty). BMD progresivně narůstala ve všech hodnocených místech po 12, 24, a 36 měsících (vždy $p < 0,005$ vs. placebo a vstupní hodnoty). Publikované výsledky prokázaly, že denosumab zvyšuje významně a rychle kostní hustotu ve všech oblastech skeletu, ať už s převahou trámčité, či kortikální kostní tkáně [21,22]. Zvýšení BMD zvláště kortikální kostní tkáně má zásadní význam pro integritu skeletu a snížení rizika fraktury.

Dlouhodobá léčba denosumabem

Zásadní otázkou v zůstává jak dlouho je třeba osteoporózu léčit. Kupříkladu terapie ve studii FREEDOM trvala tři roky, ale u většiny pacientek je nutná léčba delší.

Ve studii II. fáze (23) bylo původně 412 postmenopauzálních žen randomizováno k dvouletému podávání denosumabu, alendronátu či placebo, přičemž denosumab vedl k výraznému nárůstu BMD v páteři a kyčli. Po dvou letech byly pacientky na další dva roky randomizovány k přerušování, ukončení či pokračování léčby denosumabem, ukončení alendronátu; nebo pokračování v užívání placebo. Studii dokončilo 262 žen (23, 24). Tato studie byla poté prodloužena o další čtyři roky, po které byl všem pacientkám, které vyslovily souhlas ($n = 200$), podáván denosumab. Extenzi studie dokončilo 138 žen. U pacientek, které užívaly úhrnně 8 let denosumab ($n=88$), byl zjištěn nárůst BMD v páteři o 16,5 % a v kyčli o 6,8 % v porovnání se vstupními hodnotami na samém počátku studie, rozdíl v BMD páteře a kyčle oproti vstupním hodnotám na počátku extenze byl + 5,7 % a +1,8 %. U 12 pacientek, které užívaly prvních čtyři roky placebo, bylo následně čtyřleté podávání denosumabu spojeno s významným nárůstem BMD v kyčli a páteři, který byl plně srovnatelný se změnami BMD u žen užívajících denosumab v průběhu prvních čtyř let. Byl opět pozorován již dříve popisovaný pokles hodnot biochemických ukazatelů kostního obratu. Bezpečnostní profil byl plně srovnatelný s dříve publikovanými údaji. Osmiletá léčba denosumabem tedy vedla k dalšímu významnému nárůstu BMD a k poklesu ukazatelů kostního obratu při zachování dobrém bezpečnostním profilu (25).

Důležitou informací nám přináší výsledky extendované studie FREEDOM (26). Prodloužení studie FREEDOM je plánováno na úhrnních deset let léčby (tedy prodloužení základní studie o sedm let). Nyní jsou známy výsledky třileté extenze. Z 5928 pacientek, bylo do extenze zařazeno 4550 (77 %). 2343 žen, které byly původně léčeny denosumabem, pokračovalo nadále v této léčbě. 2207 žen, které v základní studii užívaly placebo, bylo převedeno na denosumab. U těchto žen došlo k významnému nárůstu BMD v páteři a kyčli (+9,4 % a + 4,8 %), což bylo obdobné s nárůstem BMD u denosumabem léčených žen v základní studii. Obdobný byl i pokles hodnot biochemických ukazatelů kostního obratu. V porovnání s původní placebovou skupinou zde byl významně nižší výskyt nových obratlových i mimo-obratlových zlomenin. U pacientek užívajících denosumab v základní studii i v průběhu extenze

byl nadále nižší výskyt zlomenin oproti původní placebové skupině. V průběhu 3leté extenze byly zaznamenány čtyři případy osteonekrózy čelisti, žádný případ atypické femorální zlomeniny. Trvalá šestiletá léčba denosumabem byla dobře tolerována, udržovala snížený kostní obrat, a vedla k průběžnému nárůstu BMD. Přetrvávala nízká incidence zlomenin (26).

Závěr

Dosavadní klinické studie dokazují významný účinek denosumabu na kostní tkáň: pokles kostní resorpce, zabránění dalšího ztenčování a protizace kortikální kosti a nárůst BMD v kortikálním i trabekulárním kompartmentu, což vede ke zvýšení mechanické odolnosti kostní tkáně a z toho plynoucímu poklesu rizika vzniku obratlových i mimoo-bratlových zlomenin. Subkutánní aplikace jednou za 6 měsíců je pro pacienty výhodná. Bezpečnostní profil denosumabu je výborný, dosud nebyl zjištěn vyšší výskyt nežádoucích příhod ve srovnání s placebem či alendronátem.

Literatura

- Lewiecki EM. Managing osteoporosis: challenges and strategies. *Cleve Clin J Med* 2009; 76: 457–466.
- Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. 2010; 375: 1729–1736.
- Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology* 2008; 47 (Suppl 4): iv2–8.
- Filardi S, Zebaze RM, Duan Y, et al. Femoral neck fragility in women has its structural and biomechanical basis established by periosteal modeling during growth and endocortical remodeling during aging. *Osteoporos Int* 2004; 15: 103–107.
- Bjørnerem A, Bui Q, Ghasem-Zadeh A, et al. Fracture risk and height: An association partly accounted for by cortical porosity of relatively thinner cortices. 2013 Mar 20. doi: 10.1002/jbmr.1934. [Epub ahead of print]
- Seeman E, Delmas PD, Hanley DA, et al. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1886–1894.
- Genant HK, Engelke K, Hanley DA, et al. Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 2010; 47: 131–139
- Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009; 361: 756–765.
- Simon JA, Recknor C, Moffett AH Jr, et al. Impact of denosumab on the peripheral skeleton of postmenopausal women with osteoporosis: bone density, mass, and strength of the radius, and wrist fracture. *Menopause* 2013; 20: 130–137.
- McClung MR, Zanchetta JR, Høiseth A, et al. Denosumab Densitometric Changes Assessed by Quantitative Computed Tomography at the Spine and Hip in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Clin Densitom* 2013; 16: 250–256.
- Bolognese MA, Tegljbjærg CS, Zanchetta JR, et al. Denosumab Significantly Increases DXA BMD at Both Trabecular and Cortical Sites: Results From the FREEDOM Study. *J Clin Densitom* 2013; 16: 147–153.
- Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, Wang A, Siddhanti S, Fitzpatrick LA; AMG 162 Bone Loss Study Group. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res*. 2007;22:1832–1841.
- Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, McClung MR, Ding B, Austin M, Liu Y, San Martin J, Amg Bone Loss Study Group. Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial. *Bone*. 2008;43:222–229
- McClung MR, Lewiecki EM, Geller ML, Bolognese MA, Peacock M, Weinstein RL, Ding B, Rockabrand E, Wagman RB, Miller PD. Effect of denosumab on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover: 8-year results of a phase 2 clinical trial. *Osteoporos Int*. 2013 ;24:227–35.
- Brown JP, Bone HG, Chapurlat R, Franchimont N, Brandi ML et al. Six years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: Results from the first three years of the FREEDOM extension. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting November 5–9, 2011 Chicago, IL, USA.

Korespondenční adresa:
Doc. MUDr. Štěpán Kutilek, CSc.
Osteologická ambulance Dětského oddělení
Pardubické krajské nemocnice a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice
e-mail: stepan.kutilek@nemocnice-pardubice.cz

9.2.4 Denosumab – významný pokrok v léčbě osteoporózy

DENOSUMAB – VÝZNAMNÝ POKROK V LÉČBĚ OSTEOPORÓZY

Š. Kutilek¹, P. Řeháčková²

¹Dětské oddělení Pardubické krajské nemocnice,
Pardubice, přednostka prim. MUDr. V. Němec, Ph.D.

²Center for Clinical and Basic Research (CCBR),
Pardubice, ředitel MUDr. T. Hála

Souhrn

Denosumab je plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která se specificky a s vysokou afinitou váže na RANK ligand (RANKL), čímž zabraňuje formaci osteoklastů, inhibuje jejich funkci a zkracuje jejich přežívání. V klinických studiích III. fáze byl hodnocen efekt denosumabu v porovnání s placebem a též včetně srovnání s aktivním komparátorem alendronátem. Histologické či histomorfo-metrické analýzy potvrdily zachování fyziologické struktury kosti. Zavedení denosumabu představuje významný předěl v léčbě osteoporózy.

Klíčová slova: denosumab, denzita kostního minerálu, histomorfometrie.

Úvod

Denosumab je plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která má vysokou afinitu k RANKL (Receptor activator of nuclear factor NF-kappa-B ligand), čímž inhibuje diferenciaci osteoklastů, jejich funkci a přežívání (1–3). Účinkem denosumabu dochází k poklesu kostní resorpce. Denosumab působí obdobně jako osteoprotegerin, což je cytokin neutralizující za fyziologických podmínek RANKL (4–14). Afinita denosumabu k molekule RANKL je ovšem podstatně vyšší než afinita osteoprotegerinu (2,3). Antiresorpční účinky denosumabu byly hodnoceny v dvojité zaslepených, placebem kontrolovaných, randomizovaných studiích I.–II. fáze, a některých klinických studiích III. fáze, jak jsme již v tomto periodiku referovali v roce 2009 (10). V nabízeném přehledu se budeme zabývat dosud publikovanými studiemi III. fáze léčby postmenopauzální osteoporózy denosumabem.

Klinické studie III. fáze s denosumabem

Dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie III. fáze s názvem DEFEND (Denosumab Evaluation for Preserving Bone Density) hodnotila vliv dvouletého podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) na denzitu kostního minerálu (bone mineral density – BMD) a kostní obrat u 332 postmenopauzálních žen s nízkou BMD. Denosumab po 24 měsících významně zvýšil BMD v oblasti bederní páteře (6,5 vs. -0,6 %; $P < 0,0001$) a významně zvýšil BMD v kyčli, distálním radiu a též celotělovou BMD. Kvantitativní komputerová tomografie (QCT) prokázala

zvýšení volumetrické BMD v oblasti distálního radia, došlo též ke zlepšení strukturálních parametrů v oblasti kyčle. Ukazatelé kostního obratu byly po léčbě denosumabem výrazně sníženy (15).

Další studie III. fáze klinického hodnocení byly zaměřeny jednak na porovnání vlivu denosumabu a alendronátu ohledně BMD (studie DECIDE a STAND), jednak na snížení rizika fraktury v porovnání s placebem (studie FREEDOM).

V dvojité zaslepené studii III. fáze klinického hodnocení (studie DECIDE – Determining Efficacy: Comparison of Initiating Denosumab vs. Alendronate) byl porovnáván účinek denosumabu a alendronátu na změny BMD u 1189 postmenopauzálních žen s nízkou BMD (T-skóre $\leq 2,0$ SD v oblasti bederní páteře nebo kyčle). Pacientky byly randomizovány v poměru 1:1 do skupiny léčené denosumabem (60 mg s.c. každých 6 měsíců + placebo p.o. 1x týdně) nebo alendronátem (70 mg p.o. jednou týdně + s.c. injekce placeba každých 6 měsíců). Změny v BMD byly vyhodnocovány v kyčli, krčku femuru, trochanteru, bederní páteři a distálním radiu po 6 a 12 měsících a ukazatelé kostního obratu v měsících 1, 3, 6, 9, a 12. V oblasti kyčle zvýšil významně denosumab BMD v porovnání s alendronátem (3,5 % versus 2,6 %; $p < 0,0001$) a na všech měřených místech byly po 12měsíční léčbě denosumabem zjištěny signifikantně vyšší přírůstky BMD. Denosumab vedl v porovnání s alendronátem k výraznější supresi ukazatelů kostního obratu. Bezpečnostní profil byl u obou přípravků obdobný (16,17).

Mezinárodní multicentrická, randomizovaná, dvojitě zaslepená, dvojitě maskovaná studie STAND (The Study of Transitioning from Alendronate to Denosumab) se zabývala účinností a bezpečností denosumabu při přechodu z léčby alendronátem na denosumab v porovnání s pokračující léčbou alendronátem (18). Studie trvala 12 měsíců, účastnilo se 504 žen s postmenopauzální osteoporózou, které před tím užívaly alespoň 6 měsíců alendronát (medián trvání předchozí léčby alendronátem 36 měsíců – rozpětí 6–192 měsíců). Po dobu jednoho měsíce před randomizací užívaly všechny pacientky perorálně 70 mg alendronátu 1x týdně. Poté byly randomizovány do skupiny dále užívající alendronát ve stejné dávce spolu s injekcí placeba podávanou jednou za 6 měsíců, nebo do skupiny léčené denosumabem 60 mg subkutánně jednou za 6 měsíců spolu s placebem podávaným jednou týdně. Primárním cílem byly procentuální změny BMD celkového proximálního femuru po 12 měsících, sekundární cíle byly procentuální změny BMD v bederní páteři, krčku stehenní kosti, a distální třetiny radia po 12 měsících léčby a změny hladin ukazatelů kostního obratu. Studii dokončilo 481 žen (95,4 %). Přechod z léčby alendronátem na denosumab vedl v porovnání s pokračující terapií alendronátem k vyššímu nárůstu BMD ve všech měřených místech a k dalšímu signifikantnímu poklesu ukazatelů kostního obratu. Výskyt nežádoucích příhod včetně závažných nežádoucích příhod byl v obou studovaných skupinách obdobný (18).

Pacientkám ve studiích DECIDE a STAND byl předložen dotazník týkající se jejich preference léčby (podávání tablet jednou týdně oproti podkožní injekci dvakrát ročně). 77 % pacientek upřednostnilo injekční léčbu jednou za 6 měsíců (19).

Nejvýznamnějším klinickým hodnocením s denosumabem byla dvojité zaslepená, placebem kontrolovaná studie FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months) (20), která hodnotila vliv denosumabu na výskyt nových fraktur. Zařazeno bylo 7868 žen. Studii dokončilo 6478 pacientek (82 %). Třileté podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) postmenopauzálním osteoporotickým ženám vedlo v porovnání s placebem k 68% poklesu rizika zlomenin obratlů ($p < 0,0001$) a 20% poklesu rizika mimoobratlových zlomenin ($p = 0,011$), riziko zlomenin kyčle bylo sníženo o 40 % ($p = 0,036$). BMD bederní páteře se po podávání denosumabu zvýšila za 3 roky o 9 % a v kyčli byl tento nárůst +6 % ($p < 0,0001$). Výskyt nežádoucích příhod byl v obou skupinách (denosumab versus placebo) obdobný. Denosumab tedy jednoznačně snížil riziko vertebrálních i mimoobratlových zlomenin při vynikajícím bezpečnostním profilu (20). Na základě výsledků studie FREEDOM byl denosumab registrován v USA a v Evropě pod jménem Prolia.

V rámci studie FREEDOM byl hodnocen účinek denosumabu na kostní histologii a na histomorfometrické parametry v podskupině 92 pacientek (47 užívalo denosumab, 45 užívalo placebo). Uvedené pacientky podstoupily transiliakální biopsii (68 biopsií ve 24. měsíci, 47 v 36. měsíci a 23 biopsií v obou časových bodech (21)). Kostní histologie prokázala ve všech vzorcích normální mineralizovanou lamelární kost. V pěti vzorcích pacientek léčených denosumabem však byla pozorována absence osteoidu. Tetracyklinové značení bylo přítomno ve všech placebových vzorcích a pouze v 64 % vzorků kostí pacientek léčených denosumabem. Dvojité značení tetracyklinem bylo pozorováno v 94 % placebových biopsiích a pouze v 19 % biopsiích v denosumabové skupině. Statické i dynamické parametry kostní formace byly v případě denosumabu podstatně sníženy. Resorpce byla rovněž významně redukována, počet osteoklastů byl 0,08/mm v placebové a 0,00/mm v denosumabové skupině (21). V rámci hodnocení metodou mikroCT se obě skupiny významně nelišily. Kostní biopsie byly provedeny rovněž ve 12. měsíci studie STAND porovnávací alendronát s denosumabem. Nález byl podobný jako ve studii FREEDOM, ukazatele kostního obratu byly nižší než u pacientek léčených alendronátem (21). Nález potvrzuje účinek denosumabu jako silného antiresorpčního přípravku, který inhibuje kostní obrat, přičemž kvalita kosti zůstává normální

Omezený počet bioptických vzorků od pacientů po přerušení terapie denosumabem, které byly provedeny mezi 12. a 36. měsícem po ukončení léčby, svědčí pro návrat kostního obratu na původní úroveň a pro reverzibilitu antiresorpčního efektu denosumabu (22).

Bezpečnostní profil denosumabu

Bezpečnostní profil denosumabu byl studován ve všech provedených klinických hodnoceních. Nebyl zjištěn vyšší výskyt nežádoucích příhod ve srovnání s placebem či alendronátem. Vzhledem ke skutečnosti, že denosumab zasahuje do systému tumor necrosis factor (TNF), byly vysloveny obavy z možného ovlivnění imunity léčených pacientů,

kteří by se projevil vyšším rizikem infekčních komplikací či nádorovým onemocněním. Dosavadní výsledky pro toto v žádném případě nesvědčí, na základě současných poznatků denosumab nijak nezasahuje do imunitních procesů v lidském organismu, u pacientů léčených denosumabem není vyšší výskyt infekčních komplikací ani novotvarů (2, 3, 17, 20). Nedochází ani k tvorbě protilátek proti denosumabu (2,3,17).

Úloha denosumabu v léčbě osteoporózy

Podávání denosumabu vede k výraznější supresi kostního obratu v porovnání s alendronátem. Bylo prokázáno, že účinek denosumabu je reverzibilní, na rozdíl od nejčastěji používaných antikatabolických přípravků, bisfosfonátů, se denosumab neukládá v kostní tkáni. Vzhledem k subkutánní aplikaci jeho podávání nemá nežádoucí účinky na zažívací trakt v kontrastu k perorálním bisfosfonátům (1,3,16–18). Studie švédských autorů prokázala, že denosumab představuje finančně výhodnou alternativu k perorálním bisfosfonátům, zejména u nemocných s vysokým rizikem fraktury a předpokládanou nízkou adhezí k podávání perorálních bisfosfonátů (23).

Závěr

Provedené klinické studie dokazují, že denosumab snižuje kostní resorpci a zvyšuje denzitu kostního minerálu (BMD) a zároveň zvyšuje mechanickou odolnost kostní tkáně a snižuje riziko obratlových i mimoobratlových zlomenin. Denosumab představuje zcela novou a perspektivní způsob terapie osteoporózy – biologickou léčbu. Způsob podávání denosumabu subkutánně jednou za 6 měsíců je pro pacienty výhodný, zvyšuje jejich adhezí k léčbě. Bezpečnostní profil denosumabu je výborný, dosud nebyl zjištěn vyšší výskyt nežádoucích příhod ve srovnání s placebem či alendronátem.

Literatura

1. Lewiecki EM. Managing osteoporosis: challenges and strategies. *Cleve Clin J Med* 2009;76:457–466.
2. Lewiecki EM. Denosumab – an emerging treatment for postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:467–476.
3. Lewiecki EM. RANK ligand inhibition with denosumab for the management of osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:1041–50.
4. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3540–5.
5. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142:5050–5055.
6. Fata JE, Kong YY, Li J et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41–50.
7. Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–342.
8. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390:175–179.
9. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL et al. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337–342.
10. Kutílek Š. Denosumab v léčbě osteoporózy. *Klimakterická medicína* 2009;14:9–14.

11. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS et al. Single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1059–66.
12. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ossteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3597–602.
13. Lacey DL, Tan HL, Lu J et al. Osteoprotegerin Ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157:435–48.
14. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR et al. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2007; 22:1832–41.
15. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2149–2157.
16. Brown JP, Prince RL, Deal C et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: A randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009;24:153–161.
17. Charopoulos I, Orme S, Giannoudis PV. The role of efficacy of denosumab in the treatment of osteoporosis: an update. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10:205–217.
18. Kendler DL, Roux C, Benhamou CL et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 2010;25:72–81.
19. Kendler DL, Bessette L, Hill CD et al. Preference and satisfaction with a 6-month subcutaneous injection versus a weekly tablet for treatment of low bone mass. *Osteoporos Int* 2010;21:837–846.
20. Cummings SR, San Martin J, McClung MR et al. FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009;361:756–65.
21. Reid I, Benhamou C, Bolognese M et al. Effects of Denosumab on bone histology and histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. *J Bone Miner Res* 2009; 24(Suppl 1), S9, Abstract No 1027.
22. Brown JP, Dempster DW, Ding B et al. Remodeling status in postmenopausal women who discontinued denosumab treatment. *ASBMR annual meeting 2010*; Abstract book, S22, Abstract No 1069.
23. Jonsson B, Strom O, Eisman JA et al. Cost-effectiveness of denosumab for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2011;22:967–82.

*Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.,
Osteologická poradna, Dětské oddělení
Pardubické krajské nemocnice,
Kyjevská 44, Pardubice, e-mail:
stepan.kutilek@nemocnice-pardubice.cz*

9.2.5 Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost

REMEDIA

23•3•2013

Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost

Doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.¹; PharmDr. Petra Řeháčková²

¹Dětské oddělení Pardubické krajské nemocnice, Pardubice; ²Center for Clinical and Basic Research (CCBR), Pardubice

Souhrn

Kutílek S, Řeháčková P. **Denosumab v léčbě osteoporózy – účinek na kortikální kost.** Remedias 2013; 23: x–y.

Denosumab je nový přípravek určený k léčbě osteoporózy, plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která se specificky a s vysokou afinitou váže na RANK ligand, čímž zabraňuje formaci osteoklastů, inhibuje jejich funkci a zkracuje jejich přežívání. Zavedení denosumabu do klinické praxe představuje významný přelom v léčbě osteoporózy. Zásadní význam pro integritu skeletu má kortikální kost a pevnost kortikální kosti je rozhodujícím faktorem vzniku zlomeniny. V následujícím přehledu dosud publikovaných klinických studií se budeme zabývat především účinkem denosumabu na kortikální kost.

Klíčová slova: denosumab – denzita kostního minerálu – kortikální kost – fraktury.

Summary

Kutílek S, Řeháčková P. **XX.** Remedias 2013; 23: x–y.

Key words: denosumab –

Úvod

Osteoporóza představuje významný medicínský i společenský problém – je považována za jedno z nejvíce invalidizujících a finančně náročných onemocnění v Evropě.

Novým léčivem s unikátním mechanismem účinku určeným k léčbě osteoporózy je denosumab. V předkládaném přehledu se budeme zabývat především účinkem denosumabu na kortikální kost.

Mikroskopická anatomie kostní tkáně

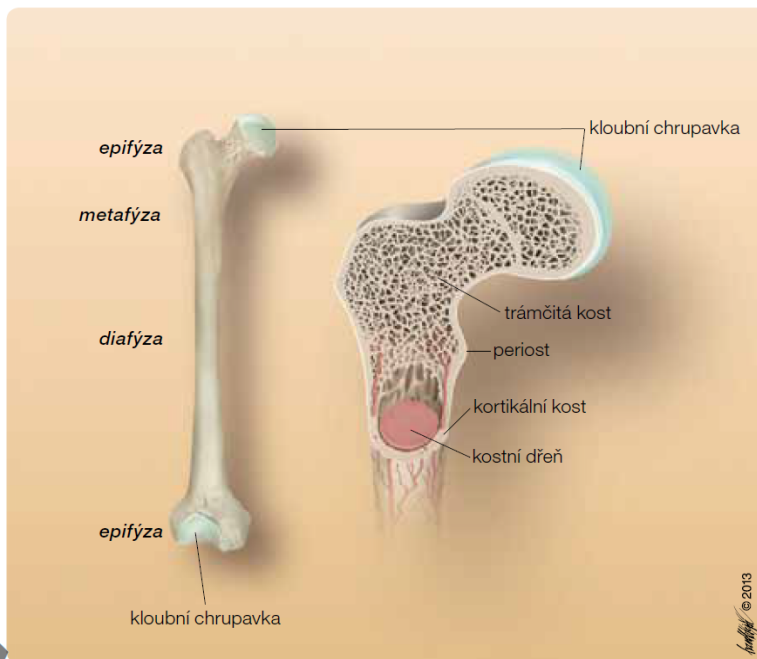
Kostní tkáň se mikroskopicky dělí na tkáň kompaktní (kortikální) a trabekulární (trámčitou, houbovitou, spongiózní). Vnější část kosti je představována silnou a hutnou kortikální kostí. V diafyzární části vytváří kortikální kost dřevěnou dutinu. Směrem k metafýze a epifýze se kortikální kost ztenčuje a obklopuje tenké, vzájemně propletené kalcifikované trámce – kost trámčitou (obr. 1). Proximální a distální partie dřevěné dutiny jsou tím uzavřeny v trámčité kostní tkáni. Trabekulární kost je oproti kosti kortikální podstatně metabolicky aktivnější, kompaktní tkáň má především mechanickou a ochrannou funkci.

Trabekulární kost

Trabekulární kost je složena buď z nepravidelných houbovitých uspořádaných trámců (trabekul), nebo jsou trabekuly uspořádány v určitých směrech.

Kortikální a trámčitá kost obsahují stejné buňky a stejnou matrix, ale liší se strukturou a funkcí: 80–90 % objemu kompaktní kostní tkáně je kalcifikováno, zatímco trabekulární tkáň je kalcifikována z pouhých 20 %. Zbývajících 80 % trabekulární kostní tkáně obsahuje kostní dřev, krevní cévy

a pojivovou tkáň. Trámčitá kost představuje pouhých 15–20 % hmotnosti skeletu. Vzhledem ke své struktuře má však podstatně větší povrch než kost kortikální (poměr 80 : 20). Trabekulární kost je ve srovnání s kostí kortikální metabolicky mnohem aktivnější, zatímco kompaktní



Obr. 1 Podélný řez dlouhou kostí.

tkáň zastává mechanickou a ochrannou funkci [1]. Trámčitá kost se nachází v oblasti metafýz a epifýz dlouhých kostí a obklopuje tak proximální a distální partie dřevěné dutiny. Pravidelné uspořádání kostních trámčů (tzv. architektura trabekulární kosti) je závislé na křivkách, v nichž se uplatňuje tlak na kost. Trabekuly tím zajišťují maximální odolnost kostní tkáně při minimálním množství materiálu [2].

Kortikální kost

Kortikální kost představuje zhruba 80–85 % celkové hmotnosti skeletu. Dle mikroskopické stavby lze strukturu kompaktní kosti dále dělit na vláknitou nebo lamelózní. Vlákenná kostní tkáň se tvoří ve vývojovém období a trvale se udržuje u nižších obratlovců a v některých kostech malých savců. U člověka se nachází v místech úponů některých vazů a šlach, ve švech lebečních kostí a v pouzdře nitroušního labyrintu. Vlákenná kost sestává z navzájem se spojujících trámčů, mezi nimiž se nacházejí kostní buňky.

U člověka je v prvním roce života postupně nahrazována kostí lamelózní [2, 3], která se skládá z několika vrstev zevních lamel spojených amorfní základní substancí. Lamely jsou pravidelně koncentricky uspořádány v závislosti na průběhu cév nebo tvoří soustředné vrstvy na povrchu kosti. Lze je rozdělit na lamely Haversovy, lamely intersticiální a lamely povrchové. Haversovy lamely tvoří koncentrické vrstvy, jejichž středem longitudinálně probíhají Haversovy kanálky, které obsahují cévy a nervy. Haversovy kanálky komunikují s kanálky Volkmannovými. Koncentricky uspořádané lamely s centrálním Haversovým kanálkem tvoří Haversův systém neboli osteon, který představuje základní strukturální stavební jednotku kortikální kosti (basic structural unit – BSU), obr. 2. Mezi Haversovými systémy jsou malé dutinky (lakuny) s kostními buňkami – osteocyty [2].

Intersticiální lamely vyplňují prostory mezi jednotlivými osteony. Jedná se o zbytky původních Haversových soustav, které byly odstraněny vrůstáním cév, okolo nichž se vytvořily nové Haversovy lamely. Povrchové lamely se nacházejí na povrchu kosti. Vznikají apoziční tvorbou kostní tkáně v periost. Silná a hutná kortikální kost tvoří především vnější část skeletu. V diafyzární části vytváří kortikální kost dřevěnou dutinu. Směrem k metafýze a epifýze se kortikální kost ztenčuje a obklopuje tenké, vzájemně propletené kalcifikované trámce – kost trámčitou. Z periostálního a endostálního povrchu vnikají kolmo do kosti Volkmannovy kanálky, v nichž probíhají cévy a nervy. Volkmannovými kanálky vstupují do kosti periostální cévy, které vzájemně anastomozují a zajišťují krevní zásobení kostní tkáně [2].

Vyšetření hodnotící kvalitu kostí

Poměr kortikální ku trabekulární kosti se různí dle lokalizace: v obratlicích je tento poměr 5 : 95 %, v krčku femuru 75 : 25 %, v radiu 95 : 5 %. Rutinně prováděné zobrazovací vyšetření hustoty kostního minerálu (bone mineral density, BMD), konkrétně dvouenergetická absorpční densitometrie (DXA, dual-energy X-ray absorptiometry), je planimetrickou metodou a nerozlišuje mezi trabekulární a kortikální kostí.

Mezi metody schopné odlišit kortikální a trabekulární tkáň patří kvantitativní výpočetní tomografie (QCT, quantitative computed tomography) a mikroCT. Periferní kvantitativní výpočetní tomografie (pQCT) umožňuje analýzu kortikální i trámčité kosti v dané oblasti končetiny, jakož i zhodnocení parametrů, jako jsou BMD, obsah kostního minerálu, kortikální obvod či tloušťka. Pomocí pQCT lze též stanovit tzv. moment setrvačnosti (moment of inertia), který hodnotí pevnost v ohybu a jehož zvýšení značí zlepšení biomechanické vlastnosti kosti. MikroCT je metoda nově používaná *in vitro* při analýze bioptických vzorků kostní tkáně, kdy je pomocí dvourozměrných projekcí rekonstruován virtuální trojrozměrný model kostní tkáně a tím je možné hodnotit její mikroskopickou strukturu.

V období mezi 20.–80. rokem života ztrácí člověk až polovinu své kostní hmoty. Relativní ztráta kostní hmoty s věkem je markantnější v trabekulární kosti, protože ta má vyšší poměr povrch/objem. Absolutní úbytek kostní hmoty je však vyšší v kortikální kosti, což významně přispívá k poklesu mechanické odolnosti kostní tkáně [4, 5].

Studie z posledního desetiletí prokazují, že kortikální kost má zásadní význam

pro integritu skeletu a pevnost kortikální kosti je rozhodujícím faktorem pro vznik zlomeniny [6]. S přibývajícím věkem dochází k úbytku kortikální hmoty, zejména v důsledku jejího ztenčení a nárůstu porozity kortikální kosti [6–8]. U postmenopauzálních žen představují mimoobratlové zlomeniny v oblastech skeletu s převahou kortikální kosti 80 % všech zlomenin. Postmenopauzální ženy s vyšší postavou mají zvýšené riziko zlomeniny v důsledku tenčí vrstvy kortikální kosti a zvýšené porozity kortikální tkáně [9].

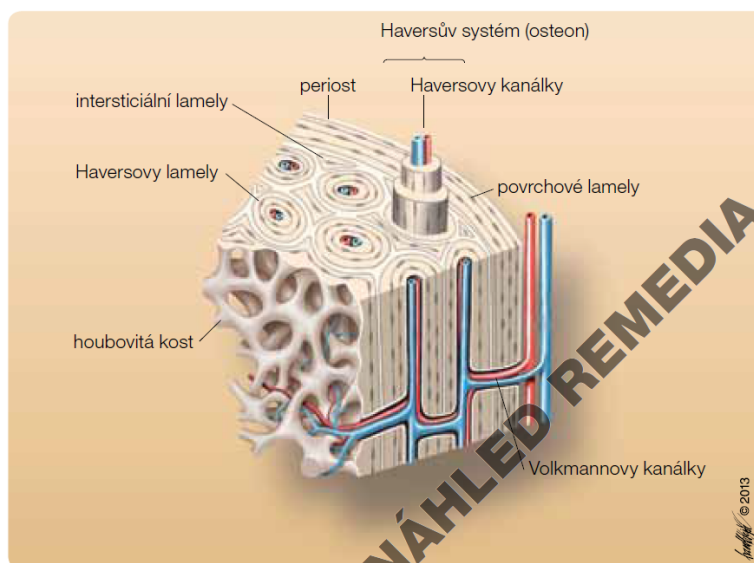
Léčivé přípravky v terapii osteoporózy

Léčivé přípravky registrované pro terapii osteoporózy lze rozdělit na osteofor- mační (osteobanabolické) a anti- resorpční (antikatabolické).

Osteobanabolické přípravky indukují nárůst množství kostní hmoty, čímž stoupá převaha kostní novotvorby nad osteoresorpcí. Osteobanabolické přípravky zahrnují parathormon a teriparatid. Stroncium ranelát se přičítá duální mechanismus účinku (efekt anti- resorpční i formační).

Mezi **antikatabolické přípravky** patří bisfosfonáty (alendronát, risedronát, ibandronát, zoledronát), selektivní modulátory estrogenních receptorů (SERM; raloxifen), kalcitonin a denosumab. Antikatabolické přípravky snižují kostní remodelaci, prodlužují životnost kostních strukturálních jednotek, čímž se prodlužuje doba, během níž dochází k akumulaci kostního minerálu, a tím stoupá kostní mineralizace.

Bisfosfonáty, které jsou hlavními reprezentanty antikatabolických přípravků, snižují dozrávání a počet osteoklastů a vedou k jejich



Obr. 2 Průřez kostí zobrazující její mikroskopickou stavbu.

apoptóze, tlumí též kostní formaci a jsou celoživotně deponovány v kostní matrix.

Významný předěl v léčbě osteoporózy představuje zavedení denosumabu. Je to plně humánní monoklonální protilátka IgG2, která má vysokou afinitu k RANKL (ligand receptoru aktivujícího nukleární faktor kappa-B), čímž inhibuje diferenciaci osteoklastů, jejich funkci a přežívání (obr. 3, 4). Po podání denosumabu dochází k poklesu kostní resorpce, k nárůstu BMD a ke snížení rizika vzniku fraktur obratlových i mimoobratlových [11–22]. Oproti působení bisfosfonátů má denosumab na kost reverzibilní účinek, neboť je degradován a není ukládán v organismu.

Vzhledem k významu kortikální kosti pro mechanickou odolnost skeletu je nutné hodnotit v tomto kontextu též účinnost antiosteoporotické léčby, zejména pak léčby antikatabolické. Pomocí metody mikroCT bylo kupříkladu prokázáno, že podávání risedronátu ženám s osteoporózou signifikantně zabraňuje nárůstu kortikální porozity v porovnání s placebem [10]. Významný vliv na kortikální kost má zejména denosumab. Jeho účinky na skelet byly hodnoceny v experimentu a též v dvojité zaslepených, placebem kontrolovaných, randomizovaných studiích fáze I–III [11, 12, 22].

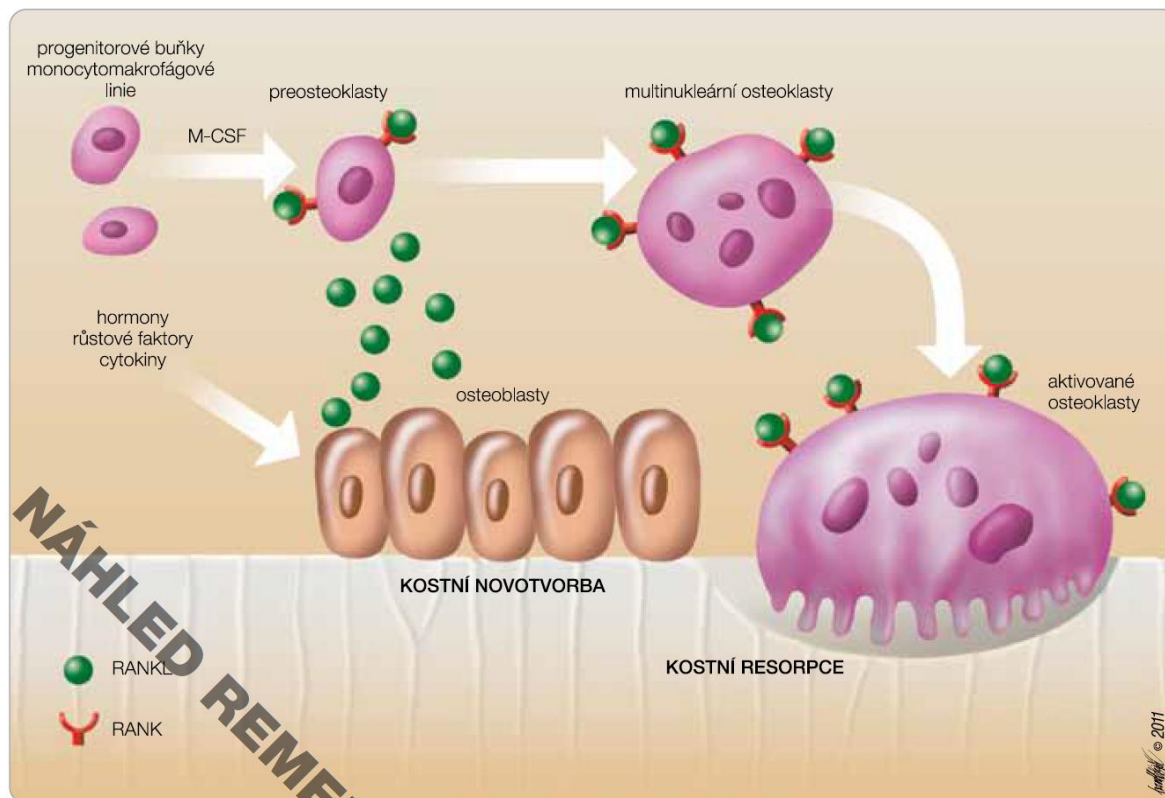
Preklinické a klinické hodnocení denosumabu Experimentální studie

V experimentu byl denosumab podáván opicím rodu *Cynomolgus* [23, 24]. Subkutánní aplikace denosumabu ovariektomovaným opicím jedenkrát měsíčně po dobu 16 měsíců vedla ve srovnání s kontrolní skupinou, které byla podávána neúčinná látka, k poklesu kostní remodelace, vzestupu plošné BMD v bederní páteři, kyčli, krčku femuru a distálním radiu, k nárůstu objemu kortikální kosti v oblasti středního radia a tibie a rovněž tak ke vzestupu mechanické odolnosti krčku femuru a bederních obratlů [23]. Histomorfometrickým vyšetřením bioptických vzorků skeletu těchto opic byla potvrzena vyšší kostní remodelace u ovariektomovaných zvířat. Podávání denosumabu vedlo k poklesu kostní remodelace, poklesu erodované plochy v trámčité kosti a rovněž tak k poklesu kortikální porozity. Tyto parametry souvisely s nárůstem BMD a mechanické odolnosti kostní tkáně [24]. Získané výsledky lze do jisté míry extrapolovat do humánní medicíny – podávání denosumabu zabraňuje dalšímu rozvoji porozity kortikální kosti a vede tak ke zlepšení její mechanické odolnosti a tím

k poklesu rizika zlomeniny. Uvedené hypotézy byly potvrzeny klinickými studiemi

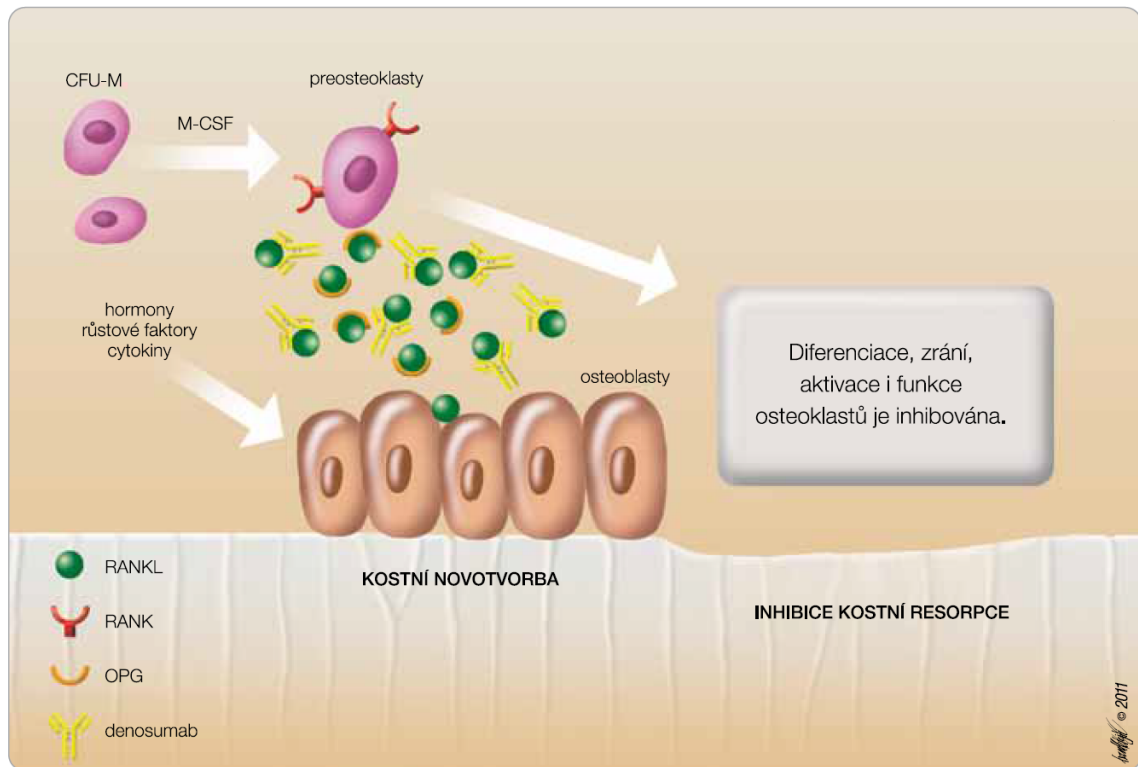
Klinická hodnocení fáze II a III

Ve dvojité zaslepené pilotní studii fáze II bylo 247 postmenopauzálních žen randomizováno k léčbě denosumabem (60 mg s.c. každých 6 měsíců), alendronátem (70 mg p.o. týdně) nebo placebem. Morfologické změny v oblasti distálního radia a distální tibie byly po 12 měsících hodnoceny pQCT v oblasti distálního radia. V placebové větvi došlo k poklesu celkové, kortikální a trabekulární BMC a rovněž tak ke ztenčení kortikální kosti v oblasti distálního radia (-2,1 % až -0,8 %). Podávání alendronátu zabránilo poklesu hodnot uvedených parametrů (-0,6 % až 2,4 %; $p = 0,051$ až $< 0,001$ vs. placebo), zatímco denosumab zabránil poklesu, a dokonce vedl ke zlepšení sledovaných hodnot (0,3 % až 3,4 %; $p < 0,001$ vs. placebo). Denosumab oproti alendronátu významněji ovlivnil změny celkové a kortikální BMD ($p < 0,024$). Obdobný nálezy by pozorován v oblasti tibie. Moment setrvačnosti byl rovněž vyšší po léčbě denosumabem ve srovnání s léčbou alendronátem ($p < 0,001$). Nebyl zjištěn rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků [25].



Obr. 3 Úloha RANKL v kostní remodelaci, převzato z Remedia 3/2011.

Osteoblasty v kostní tkáni produkují cytokin RANKL. Jeho vazba na receptor (RANK) je klíčová pro další děje osteogeneze. M-CSF – růstový faktor (macrophage colony-stimulating factor); RANK –receptor aktivující nukleární faktor κ B; RANKL – ligand RANK



Obr. 4 Mechanismus účinku denosumabu; převzato z *Remedia* 3/2011.

Denosumab, monoklonální protilátka proti RANKL, se kompetitivně váže na RANKL, čímž znemožňuje interakci RANK-RANKL, klíčovou v procesu osteoklastogeneze.

OPG – osteoprotegerin; RANK –receptor aktivující nukleární faktor κ B; RANKL – ligand RANK

Dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie fáze III s názvem DEFEND (Denosumab Evaluation for Preserving Bone Density) hodnotila vliv dvouletého podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) na BMD a kostní obrát u 332 postmenopauzálních žen s nízkou BMD. Metodou QCT byly též v oblasti distálního radia hodnoceny změny volumetrické kostní hustoty, volumetrický obsah kostního minerálu, tloušťka kortikální kosti, její objem a obvod, a též polární moment setrvačnosti, který je ukazatelem mechanické odolnosti kosti. Denosumab po 24 měsících významně zvýšil BMD v oblasti bederní páteře (6,5 vs. -0,6 %; $p < 0,0001$) a významně zvýšil BMD v kyčli, distálním radii a též celotělovou BMD. Metoda QCT prokázala u pacientek léčených denosumabem oproti placebu zvýšení volumetrické BMD i volumetrického obsahu kostního minerálu kortikální kosti v oblasti distálního radia ($p < 0,001$), nárůst tloušťky kortikální kosti, rovněž tak se zlepšil polární moment setrvačnosti (+6,6 %; $p < 0,0001$). Došlo též ke zlepšení strukturálních parametrů v oblasti kyčle. Ukazatele kostního obrátu byly po léčbě denosumabem výrazně sníženy [21, 26].

Nejrozsáhlejším a nejvýznamnějším klinickým hodnocením s denosumabem byla dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every 6 Months) [27], která hodnotila vliv denosumabu na výskyt nových fraktur. Zařazeno bylo 7868 žen. Studii dokončilo 6478 pacientek (82 %). Tříleté podávání denosumabu (60 mg s.c. každých 6 měsíců) postmenopauzálním osteoporotickým ženám vedlo v porovnání s placebem k 68% poklesu rizika zlomenin obratlů ($p < 0,0001$) a 20% poklesu rizika mimoobratlových zlomenin ($p = 0,011$), riziko zlomenin kyčle bylo sníženo o 40 % ($p = 0,036$). BMD bederní páteře se po podávání denosumabu zvýšila za tři roky o 9 % a v kyčli představoval tento nárůst 6 % ($p < 0,0001$). Výskyt nežádoucích příhod byl v obou skupinách (denosumab vs. placebo) obdobný. Denosumab tedy jednoznačně snížil riziko vzniku obratlových i mimoobratlových zlomenin při vynikajícím bezpečnostním profilu [27].

V rámci studie FREEDOM bylo též provedeno hodnocení vlivu denosumabu na kostní hustotu a mechanickou odolnost trámčité a kortikální tkáně v oblasti

radia [28]. BMD radia, obsah kostního minerálu a polární moment setrvačnosti byly vyšetřeny v prespecifikovaných podstudiích za použití DXA (placebo, $n = 209$; denosumab, $n = 232$) nebo QCT (placebo, $n = 48$; denosumab, $n = 62$). Prespecifikovaná analýza vyhodnotila výskyt zlomenin zápěstí u všech účastnic studie FREEDOM, zatímco v *post hoc* analýze byly hodnoceny ženy s vyšším rizikem zlomeniny (T-skóre BMD krčku femuru $\leq -2,5$ SD; placebo, $n = 1406$; denosumab, $n = 1384$). Denosumab signifikantně zvýšil BMD (vyhodnoceno metodou DXA) a volumetrickou BMD, obsah kostního minerálu a polární moment setrvačnosti (hodnoceno QCT) v porovnání s placebem v kortikální i trámčité kosti radia ($p < 0,05$). Výskyt zlomeniny zápěstí byl po 36 měsících léčby 2,9 % v placebové skupině a 2,5 % u pacientek léčených denosumabem (pokles relativního rizika o 16 %; $p = 0,21$). U žen s vyšším rizikem zlomeniny (T-skóre BMD krčku femuru $\leq -2,5$ SD) denosumab významně snížil výskyt fraktury zápěstí (placebo – 4,0 %; denosumab – 2,4 %; pokles relativního rizika o 40 %; pokles absolutního rizika o 1,6 %; $p = 0,03$).

Z uvedených výsledků vyplývá, že denosumab oproti placebu významně zlepšuje BMD, množství a kvalitu trámčité a kortikální tkáně v oblasti radia [28]. U žen s vyšším rizikem zlomeniny denosumab snižuje riziko vzniku fraktur zápěstí [28].

Ve studii FREEDOM byla rovněž hodnocena metodou QCT volumetrická BMD v oblasti bederní páteře, kyčle a krčku femuru při vstupním vyšetření a po 12, 24 a 36 měsících [29]. Jednalo se o podskupinu 209 žen. Signifikantní nárůst plošné a volumetrické BMD ve všech hodnocených oblastech byl patrný jak v průběhu času u pacientek léčených denosumabem, tak v porovnání s placebem. Po 36 měsících léčby denosumabem činil rozdíl volumetrické BMD v bederní páteři, kyčli a krčku femuru oproti placebu 21,8 %, 7,8 %, a 5,9 % (vždy $p \leq 0,0001$). V porovnání s placebem byl patrný nárůst obsahu kostního minerálu v kyčli ($p < 0,0001$), který souvisel s významným zvýšením obsahu kostního minerálu v kortikální kosti ($p < 0,0001$). Uvedené výsledky studie FREEDOM dokazují pozitivní účinek denosumabu na kortikální i trámčitou kostní tkáň [29].

V rámci studie FREEDOM byla provedena též podstudie se 441 účastnicemi, v níž byla hodnocena plošná BMD metodou DXA, a to v oblasti bederní páteře, kyčle, krčku femuru, trochanteru a dolní třetiny radia; též byla vyhodnocena celotělová denzita. Signifikantní nárůst BMD po podání denosumabu byl patrný již po jednom měsíci v bederní páteři, kyčli a trochanteru (vždy $p < 0,005$ vs. placebo a vstupní hodnoty). BMD progresivně narůstala ve všech hodnocených místech po 12, 24 a 36 měsících (vždy $p < 0,005$ vs. placebo a vstupní hodnoty). Tyto výsledky prokázaly, že denosumab zvyšuje významně a rychle kostní denzitu ve všech oblastech skeletu, ať už s převahou trámčité, či kortikální kostní tkáně [29, 30].

Bezpečnostní profil denosumabu

Bezpečnostní profil denosumabu byl hodnocen vždy ve všech provedených klinických studiích. Nebyl zjištěn vyšší výskyt nežádoucích příhod ve srovnání s placebem či alendronátem. Navzdory skutečnosti, že denosumab zasahuje do

systému tumor nekrotizujícího faktoru (tumor necrosis factor – TNF), neovlivňuje toto léčivo průběh imunitních procesů v lidském organismu, u pacientů léčených denosumabem není zaznamenán vyšší výskyt infekčních komplikací ani novotvarů [12, 22]. U léčených pacientů nebyla prokázána ani tvorba protilátek proti denosumabu [12, 22].

Závěr

Dosavadní klinické studie dokazují pozitivní účinek denosumabu na kostní tkáň: pokles kostní resorpce, zabránění dalšímu ztenčování a porotizace kortikální kosti a nárůst BMD v kortikálním i trabekulárním kompartmentu. Důsledkem těchto změn je zvýšení mechanické odolnosti kostní tkáně a z toho plynoucí pokles rizika vzniku obratlových i mimoobratlových zlomenin. Denosumab představuje zcela nový a perspektivní způsob terapie osteoporózy – biologickou léčbu. Subkutánní aplikace jednou za 6 měsíců je pro pacienty výhodná. Bezpečnostní profil denosumabu je výborný, dosud nebyl zjištěn vyšší výskyt nežádoucích příhod ve srovnání s placebem či alendronátem.

Literatura

- [1] Robey PM, Boskey AL. Extracellular matrix and biomineralization of bone. In FAVUS, MJ. (Ed.) *Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th ed. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2006, p. 12–18.
- [2] Dempster DW. Anatomy and functions of the adult skeleton. In FAVUS, MJ. (Ed.) *Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th ed. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2006, p. 7–11.
- [3] Kovacs CS. Skeletal physiology: Fetus and neonate. In FAVUS, MJ. (Ed.) *Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th ed. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), 2006, p. 50–55.
- [4] Gordon CL, Halton JM, Atkinson SA, Webber CE. The contributions of growth and puberty to peak bone mass. *Growth, Development, Aging* 1991; 55: 257–262.
- [5] Seeman E. *Advances in the study of osteoporosis in men*. In Meunier PJ., (Ed.) *Osteoporosis: Diagnosis and Management*. Martin Dunitz, London, 1998, p. 211–232.
- [6] Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet* 2010; 375: 1729–1736.
- [7] Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology* 2008; 47 (Suppl 4): iv2–8.
- [8] Filardi S, Zebaze RM, Duan Y, et al. Femoral neck fragility in women has its structural and biomechanical basis established by periosteal modeling during growth and endocortical remodeling during aging. *Osteoporosis Int* 2004; 15: 103–107.
- [9] Bjørnerem A, Bui Q, Ghasem-Zadeh A, et al. Fracture risk and height: An association partly accounted for by cortical porosity of relatively thinner cortices. 2013 Mar 20. doi: 10.1002/jbmr.1934. [Epub ahead of print]
- [10] Borah B, Dufresne T, Nurre J, et al. Risedronate reduces intracortical porosity in women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 41–47.
- [11] Lewiecki EM. Managing osteoporosis: challenges and strategies. *Cleve Clin J Med* 2009; 76: 457–466.
- [12] Lewiecki EM. Denosumab – an emerging treatment for postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 467–476.
- [13] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3540–3545.
- [14] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050–5055.
- [15] Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000; 103: 41–50.
- [16] Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342.
- [17] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175–179.
- [18] Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. Single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1059–1066.
- [19] McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006; 354: 821–831.
- [20] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3597–3602.
- [21] Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2149–2157.
- [22] Charopoulos I, Orme S, Giannoudis PV. The role of efficacy of denosumab in the treatment of osteoporosis: an update. *Expert Opin Drug Saf* 2011; 10: 205–217.
- [23] Ominsky MS, Stouch B, Schroeder J, et al. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* 2011; 49: 162–173.
- [24] Kostenuik PJ, Smith SY, Jollett J, et al. Decreased bone remodeling and porosity are associated with improved bone strength in ovariectomized cynomolgus monkeys treated with denosumab, a fully human RANKL antibody. *Bone* 2011; 49: 151–161.
- [25] Seeman E, Delmas PD, Hanley DA, et al. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 1886–1894.
- [26] Genant HK, Engelke K, Hanley DA, et al. Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 2010; 47: 131–139.
- [27] Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2009; 361: 756–765.
- [28] Simon JA, Recknor C, Moffett AH Jr, et al. Impact of denosumab on the peripheral skeleton of postmenopausal women with osteoporosis: bone density, mass, and strength of the radius, and wrist fracture. *Menopause* 2013; 20: 130–137.
- [29] McClung MR, Zanchetta JR, Hoiseith A, et al. Denosumab Densitometric Changes Assessed by Quantitative Computed Tomography at the Spine and Hip in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Clin Densitom* 2013; 16: 250–256.
- [30] Bolognese MA, Teglbjærg CS, Zanchetta JR, et al. Denosumab Significantly Increases DXA BMD at Both Trabecular and Cortical Sites: Results From the FREEDOM Study. *J Clin Densitom* 2013; 16: 147–153.

9.2.6 Modern methods of characterization of mechanical properties of viscoelastic bodies and mechanical matching of artificial and biological materials

Stanislav Doubal, Monika Kucharova, Petra Rehackova, Adela Hradecka

Department of Biophysics and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove,
Charles University in Prague, Czech Republic.

e-mail Doubal@faf.cuni.cz

Abstract

This paper provides a survey of recent methodology of characterizing dynamic behavior of viscoelastic bodies. A special attention is paid to problems of mechanical compatibility of artificial and biological structures. A detailed analysis of mechanical matching of skin and plasters or bondages is presented. The criterion for mechanical matching of two membranes is derived.

Key words: viscoelasticity-complex modulus- mechanical compatibility-plasters-bondages

Introduction

This paper aims to provide a survey of recent methodology of characterizing dynamic behavior of viscoelastic bodies, including examples of its applications in pharmacy. Specific attention is paid to problems of mechanical compatibility of artificial and biological structures.

Applications of medical plasters, bandages, prosthesis, replacements and many other artificial auxiliaries or supporting tools lead usually to permanent mechanical contact with biological structures. These artificial structures and adjoining biological materials should be mechanically compatible.¹ Mechanical compatibility means that the deformations are the same or, at least, sufficiently similar in both structures.

Mechanical incompatibility of these artificial structures and adjoining biological materials may lead to health problems and, in less critical situations, noticeable discomfort. The origin of these problems lies in tangent forces on the boundary between mechanically incompatible structures. These forces may result, among others, in tear-off plasters and irritation of adjacent biological structures. Generally, the mechanical incompatibility may

lead to inflammation and other health complications. A disintegration of the connection between artificial and biological structures cannot be excluded.

In practice, the solution of these problems still depends mainly on experience. However, quantitative solution is principally possible, providing modern theory of viscosity is applied and adequate methodology of measurements is used. ²

Theoretical background

Solution of problems of mechanical matching requires knowledge of mechanical behavior of structures under study. Mechanical behavior may be defined as relationship between forces and deformations. In case of viscoelastic bodies, including virtually all biological structures, mechanical behavior depends on their elastic as well as viscose properties.

Conventional approach to characterization of mechanical behavior of viscoelastic bodies is based on the identification of corresponding rheological model. Classical rheological models are structures combining several elastic and viscose bodies. The well known and often applied model is the Voigt's model. It is possible to demonstrate, theoretically as well as experimentally, that classical rheological models do not provide satisfactory characterization of dynamic behavior of viscoelastic bodies. Extended viscoelastic models with additional non-linear elements also do not lead to compliance with reality.

The more recent approach does not try to find a rheological model. Instead, the main idea is based on mathematical models and on theory of linear differential equations and Fourier transform.¹ Mechanical behavior of viscoelastic bodies is quantified by complex dynamic moduli or complex dynamic stiffnesses. These characteristics fully describe mechanical behavior of linear or linearized mechanical systems.

For complex stiffness $S(i\omega)$ it holds that:

$$S(i\omega) = \frac{F(i\omega)}{l(i\omega)} \quad (1)$$

where $F(i\omega)$ is the phasor representation of force , $l(i\omega)$ is the phasor representation of deformation, i is the imaginary unit $i = \sqrt{-1}$, ω is the angular frequency.

The knowledge of the relationships between amplitudes of forces and deformations is important in many situations. The ratio of the amplitude of force to the amplitude of deformation is given by the absolute value of the complex stiffness:

$$|S(\omega)| = \sqrt{S_{RE}^2(\omega) + S_{IM}^2(\omega)}, \quad (2)$$

where S_{RE} is the real part of the complex stiffness and S_{IM} is the imaginary part of the complex stiffness.

Complex modulus is often used in the case of tensile loading. Analogically to the equation (1), the following equation holds for the complex modulus $E(i\omega)$:

$$E(i\omega) = \frac{\sigma(i\omega)}{\varepsilon(i\omega)} \quad (3)$$

where $\sigma(i\omega)$ is the phasor representation of stress, $\varepsilon(i\omega)$ is the phasor representation of strain.

The ratio of the amplitude of stress to the amplitude of strain is given by the absolute value of the complex dynamic modulus:

$$|E(\omega)| = \sqrt{E_{RE}^2(\omega) + E_{IM}^2(\omega)}, \quad (4)$$

where E_{RE} is the real part of the complex modulus and E_{IM} is the imaginary part of the complex modulus.

The imaginary part of the complex modulus (loss modulus) characterizes dissipative energy losses in a mechanical system. The real part of the complex modulus (conservative or storage modulus) characterizes energy stored in a mechanical system.

Loss factor L is the ratio between loss and storage modulus.

$$L(i\omega) = \frac{E_{IM}}{E_{RE}} \quad (5)$$

The loss factor describes the ratio between dissipative energy and conservative energy in mechanical system during dynamic process.

In tensile loading of a uniform rod, the complex modulus may be calculated from its complex stiffness and the rod geometry according to the formula (6):

$$E(i\omega) = S(i\omega) \frac{l}{A} \quad (6)$$

where A is the cross section area of the rod, l is the length of the rod.

Measurement

Currently available apparatuses for measurement of complex dynamic moduli or complex dynamic stiffness's are so called Dynamic Mechanical Analyzers (DMA).³ Measurements are based on the measurement of the relationship between harmonic forces and harmonic deformations. The DMA apparatuses measure the ratio between amplitudes of forces and amplitudes of deformations and the phase shift between forces and deformations for different frequencies. The results are frequency dependence of storage and loss moduli. Usually the loss factor is also calculated.

More modern measurements are based on mechanical resonance principle. Resonance Analyzers (RA) enable more sensitive measurements, RA are less complicated technically in comparison with DMA and less expensive.⁴

Mechanical matching

Solution of problems of mechanical matching requires knowledge of the structure and the geometry of the system as well as knowledge of mechanical properties of components of the system. It may be a particularly complicated and difficult task.

The analysis of mechanical matching of thin structures is relatively easy. Pharmaceutically interesting is for example the mechanical matching of skin and plasters, vessels walls and stents, or body surface and bandages.

For illustration, the analysis of mechanical matching of skin and plasters will be discussed in more details. Human skin as well as plasters may be considered as a membrane covering sub-dermal and other inner structures.⁵ In membranes, differences of pressures inside and outside of the membrane lead to changes of the membrane geometry according to Laplace law.⁶ For spherical shape of a membrane it holds:

$$T = \frac{PR}{2} \quad (7)$$

where T is the membrane tension, P is the pressure difference, R is the radius of curvature.

Membrane tension T is force per length:

$$T = \frac{F}{L} \quad (8)$$

For stress in membrane it holds:

$$\sigma = \frac{T}{d} \quad (9)$$

where d is the membrane thickness.

Also holds:

$$\sigma = \frac{F}{d L} \quad (9)$$

and

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (9)$$

where A is the cross section area of membrane.

Relative deformation ε of membrane is (see formula 3):

$$\varepsilon(i\omega) = \frac{\sigma(i\omega)}{E(i\omega)} \quad (10)$$

Consequently, on the basis of measurement of pressure and radius of curvature, it is possible to calculate the membrane tension and the stress in the membrane. Furthermore, the deformation may also be calculated.

Membrane thickness is, according to its definition, much smaller than the curvature radius. Consequently tensions in membranes are the same (see Fig. 2). For strains in membranes holds:

$$\sigma_1 = \frac{T}{d_1} \quad (11)$$

and

$$\sigma_2 = \frac{T}{d_2} \quad (12)$$

As the condition for mechanical matching is

$$\varepsilon_1 = \varepsilon_2, \quad (13)$$

the condition of mechanical matching for two membranes is:

$$\frac{E_1(i\omega)}{E_2(i\omega)} = \frac{d_2}{d_1} \quad (14)$$

Example: Elastic modulus of material of medical plaster is 10 MPa. Suppose that the plaster is applied on skin. Suppose that elastic modulus of skin is 1 MPa and thickness of skin is 1 mm. Mechanical matching thus requires the thickness of plaster 0,1 mm.

Conclusions

Albeit the solution of mechanical matching of heterogeneous structures is in general a complicated problem, application of Laplace law may lead to relatively easy methodology in case of mechanical matching of walls surrounding large objects. The Young–Laplace equation (Laplace law) relates the pressure difference to the shape changes and wall tension (eq. 7) in case of a membrane surrounding large objects. In other words, radii of curvature must be much greater than the thickness of walls.

The methodology outlined in this paper may be applied to solve problems of mechanical matching of medical plasters and bandages. We hope that it will help manufactures to improve quality of these products. On the other hand, application of this theory requires appropriate experimental equipment.^{7,8} Mainly meters for determination of strain-stress diagrams and complex moduli are necessary.

References

1. Doubal, S., Klemra, P., Kucharova, M.: Mechanical Behavior of Viscoelastic bodies (in Czech), Prague, Karolinum, 2011.
2. Kucharova, M., Doubal, S., Klemra, P., Rejchrt, P., Navratil, M.: Viscoelasticity of biological materials – measurement and practical impact on biomedicine. *Physiol. Res.* (Suppl. 1), 56, 2007, 33-37.
3. Lakes, R. S.: Viscoelastic measurement techniques. *Review of Scientific Instruments*, 75, 2004, 797-810.
4. Doubal, S., et al.: Appliance for measurement of viscoelastic materials. Charles University in Prague, 2010, Utility. 20792, 9.4.
5. Doubal, S., Klemra, P.: Visco-elastic response of human skin and aging. *J. Amer. Aging Assoc.*, 3, 2002, 115-117.

6. Basford, J. R.: The law of Laplace and its relevance to contemporary medicine and rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil.*, 2002, 83, 1165-70.
7. Kucharova, M., Doubal, S., Klemra, P., Rejchrt, P., Navratil, M,: Viscoelasticity of biological materials – measurement and practical impact on biomedicine. *Physiol. Res.* (Suppl. 1), 56, 2007, 33-37.
8. Doubal, S., et al.: A New Approach to Measurement of Viscoelastic Parameters of Biological Structures. *Proceedings of Second Fascia Research Congress, 2009, Amsterdam, Vrije Universiteit*, 107.