

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Iveta Gradošová

2012

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Klinická biochemie

Sledování kostního metabolismu ovlivněného vybranými léky

Monitoring of bone metabolism affected by selected drugs

Mgr. Iveta Gradošová

Školitel: doc. MUDr. Helena Živná, CSc.
Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Hradec Králové, 2012

Obhajoba dne: 27. září 2012

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové 31. května 2012

Poděkování

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat mé školitelce doc. MUDr. Heleně Živné, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, vstřícnost a trpělivost při zpracování disertační práce.

Zvláště bych ráda poděkovala panu doc. MUDr. Pavlovi Živnému, CSc. za cenné rady, připomínky a předané zkušenosti z oboru osteologie. Můj dík také patří panu prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h. c. za projevený zájem a podporu, kterou mi v souvislosti s mou prací poskytoval během celého studia. Dále bych ráda poděkovala Dagmar Ježkové a Kateřině Šildbergerové za pomoc při práci s laboratorními zvířaty. RNDr. Evě Čermákové děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Děkuji také paní prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. za umožnění provedení analýz Western blot na katedře radiobiologie na Fakultě vojenského zdravotnictví a obrany.

Velké poděkování patří mým rodičům a přítelovi Pavlovi za poskytnutí možnosti dalšího vzdělání, seberealizace a také za jejich trpělivost.

Tato disertační práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906, grantem Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové s podporou firmy Roche, SVV-2010-62051, SVV-2011-262902 a SVV-2012-264902

Obsah

1.	Úvod do problematiky	14
1.1	Markery kostního obratu	14
1.1.1	Kostní izoforma alkalické fosfatázy.....	15
1.1.2	Osteokalcin	15
1.1.3	Markery kolagenu typu I.....	16
1.2	Dvouenergiová rentgenová absorpciometrie	16
1.3	Regulace remodelace kostní tkáně	17
1.3.1	Androgeny.....	17
1.3.2	Insulinu podobný růstový faktor (IGF-1; Insulin like Growth Factor 1)....	19
1.3.3	Kostní morfogenetické proteiny (BMP)	20
1.3.4	RANK/RANKL/OPG	20
1.4	Vliv arteriální hypertenze na kostní metabolismus	21
1.5	Vliv hypercholesterolemie na kostní metabolismus.....	22
1.6	Potkan jako experimentální model v osteologii	22
1.7	Léčiva ze skupiny hypercholesterolemik a antihypertenziv	23
1.7.1	Ezetimib	23
1.7.2	Atorvastatin	25
1.7.3	Amlodipin.....	27
1.7.4	Metoprolol	29
2	Cíle disertační práce	31
3	Experimentální část	32
3.1	Experimentální zvířata	32
3.2	Podávané léky	33
3.3	Experimenty	34
3.4	Materiál a metody.....	36
3.4.1	Stanovení kostních markerů	36
3.4.2	Stanovení koncentrace lipidů v séru a vápníku v séru a v tibia.....	37
3.4.3	Měření kostní minerální hustoty	38
3.4.4	Testování mechanické odolnosti kostní tkáně	39
3.4.5	Stanovení množství kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) metodou Western blot.....	40
3.4.6	Statistická analýza a zpracování dat	44
4	Výsledky.....	45
4.1	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů.....	45
4.1.1	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar.....	45
4.2	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů	46
4.2.1	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar	47
4.2.2	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar	49
4.3	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů.....	57
4.3.1	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar	57

4.3.2	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar	60
4.3.3	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů	66
4.4	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů.....	71
4.4.1	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar	71
4.4.2	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar	73
4.4.3	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů	80
4.5	Vliv kombinace léčiv amlodipinu a atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů	85
4.5.1	Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar	85
5	Diskuse.....	88
5.1	Vliv orchidektomie u potkanů.....	88
5.2	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů.....	90
5.3	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů	90
5.4	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů.....	93
5.1	Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů	95
5.2	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů.....	96
6	Závěry	99
7	Souhrn	102
8	Summary.....	104
9	Použitá literatura	106

Seznam obrázků

Obrázek 1: Odlišná regulace růstu a udržení mužského skeletu sexuálními hormony..	19
Obrázek 2: BMP signalizace prostřednictvím BMP receptorů a Smad.....	20
Obrázek 3: Komunikace mezi osteoblasty a osteoklasty cestou RANK/RANKL/OPG.....	21
Obrázek 4: Chemický strukturní vzorec ezetimibu	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 5: Chemický strukturní vzorec atorvastatinu .	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 6: Ovlivnění biosyntetické dráhy cholesterolu statiny a aminobisfosfonáty. .	26
Obrázek 7: Chemický strukturní vzorec amlodipinu.....	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 8: Chemický strukturní vzorec metoprololu	1
Obrázek 9: Scan potkana se zvýrazněnými oblastmi hodnocení kostní minerální hustoty	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 10: Očištěný femur a jeho scan s vyznačenými hodnocenými oblastmi kostní minerální hustoty.....	1
Obrázek 11: Mechanické testování femurů I.....	39
Obrázek 12: Mechanické testování femurů II.....	40
Obrázek 13: Vliv ezetimibu na hladinu BMP- 2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.....	46
Obrázek 14: Vliv atorvastatinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.....	49
Obrázek 15: Vliv amlodipinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.....	60
Obrázek 16: Vliv metoprololu na hladinu BMP- 2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.....	73
Obrázek 17: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.	87

Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení dle WHO podle naměřených hodnot BMD.	17
Tabulka 2: Vliv ezetimibu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.	46
Tabulka 3: Vliv ezetimibu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.	46
Tabulka 4: Vliv atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar....	48
Tabulka 5: Vliv atorvastatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.	49
Tabulka 6: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.	51
Tabulka 7: Vliv orchidektomie a atorvastatinu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.	51
Tabulka 8: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na lipidové spektrum v séru u potkanů kmene Wistar.....	52
Tabulka 9: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.	55
Tabulka 10: Vliv amlodipinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar....	59
Tabulka 11: Vliv amlodipinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.	59
Tabulka 12: Vliv orchidektomie a amlodipinu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.	61
Tabulka 13: Vliv orchidektomie a amlodipinu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.	61
Tabulka 14: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.	64
Tabulka 15: Vliv orchidektomie a amlodipinu na tělesnou hmotnost spontánně hypertenzní potkanů na začátku a na konci experimentu.	67
Tabulka 16: Vliv orchidektomie a amlodipinu u spontánně hypertenzních potkanů na stavbu těla.....	67
Tabulka 17: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu u spontánně hypertenzních potkanů.....	70
Tabulka 18: Vliv orchidektomie a amlodipinu na parametry a pevnost femurů u spontánně hypertenzních.....	70
Tabulka 19: Vliv metoprololu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar... ..	72
Tabulka 20: Vliv metoprololu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.	72
Tabulka 21: Vliv orchidektomie a metoprololu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.	74
Tabulka 22: Vliv orchidektomie a metoprololu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.	74

Tabulka 23: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.	78
Tabulka 24: Vliv orchidektomie a metoprololu na tělesnou hmotnost spontánně hypertenzních potkanů na začátku a na konci experimentu.....	81
Tabulka 25: Vliv orchidektomie a metoprololu u spontánně hypertenzních potkanů na stavbu těla.....	81
Tabulka 26: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu u spontánně hypertenzních potkanů.....	84
Tabulka 27: Vliv orchidektomie a metoprololu na parametry a pevnost femurů u spontánně hypertenzních potkanů.....	84
Tabulka 28: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.....	86
Tabulka 29: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.....	87

Seznam grafů

Graf 1: Vliv ezetimibu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.	45
Graf 2: Vliv atorvastatinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.	48
Graf 3: Vliv orchidektomie a atorvastatinu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.	52
Graf 4: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.	53
Graf 5: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.	54
Graf 6: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.	56
Graf 7: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.	57
Graf 8: Vliv amlodipinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar. ...	58
Graf 9: Vliv orchidektomie a amlodipinu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.	61
Graf 10: Vliv orchidektomie a amlodipinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.	62
Graf 11: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.	63
Graf 12: Vliv orchidektomie a amlodipinu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.	65
Graf 13: Vliv orchidektomie a amlodipinu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.	66
Graf 14: Vliv orchidektomie a amlodipinu u spontánně hypertenzních potkanů na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.	68
Graf 15: Vliv orchidektomie a amlodipinu na koncentraci kostních markerů u spontánně hypertenzních potkanů.	69
Graf 16: Vliv metoprololu na koncentraci kostních markerů v séru u potkanů kmene Wistar.	71
Graf 17: Vliv orchidektomie a metoprololu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.	75
Graf 18: Vliv orchidektomie a metoprololu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.	76
Graf 19: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.	77
Graf 20: Vliv orchidektomie a metoprololu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.	79
Graf 21: Vliv orchidektomie a metoprololu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.	80
Graf 22: Vliv orchidektomie a metoprololu u spontánně hypertenzních potkanů na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.	82
Graf 23: Vliv orchidektomie a metoprololu na koncentraci kostních markerů u spontánně hypertenzních potkanů.	83
Graf 24: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na koncentraci kostních markerů v séru u potkanů kmene Wistar.	86

Použité zkratky

ALP	alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenní receptor (androgen receptor)
BALP	kostní izoforma alkalické fosfatázy (bone alkaline phosphatase)
BMD	hustota kostního minerálu (bone mineral density)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
BMPR	receptor pro kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein receptor)
BW	tělesná hmotnost (body weight)
CTX	karboxyterminální telopeptid kolagenu I s příčnými vazbami (carboxy-terminal collagen crosslinks)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DHEA	dehydroepiandrosteron
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (dual energy X-ray absorptiometry)
ELISA	Enzymově značená imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ER α (β)	estrogenní receptor (estrogen receptor) alfa (beta)
FN HK	Fakultní nemocnice v Hradci Králové
GLA	kyselina glutámová (glutamic acid)
GTP	guanosin trifosfát (guanosine triphosphate)
HDL-CHOL	lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein HDL)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A
CHOL	cholesterol
i. m.	nitrosvalový (intramuskulární)
ICTP	karboxyterminální telopeptid kolagenu I (carboxyterminal telopeptide of type I collagen)
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor-1 (insulin-like growth factor-1)
IL-6	interleukin 6
kDa	kilodalton

KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL-CHOL	lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein LDL)
NCSS	Number Cruncher Statistical System
NPC1L1	Niemann - Pick C1 like protein 1
NTX	aminoterminální telopeptid kolagenu I s příčnými vazbami (amino-terminal collagen crosslinks)
OC	osteokalcin
OP	osteoporóza
OPG	osteoprotegerin
PBM	maximum kostní hmoty (peak bone mass)
Pi	anorganický fosfát (inorganic phosphate)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PICP	karboxyterminální propeptid prokolagenu typu I (carboxy-terminal propeptide of type I collagen)
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (amino-terminal propeptide of type I collagen)
PTH	parathormon
PTHrP	protein podobný parathormonu (Parathormone related protein)
RANK	receptor aktivující nukleární faktor kappa B (receptor activator of nuclear factor kappa B)
RANKL	ligand pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
rtg	rentgen
SD	standardní odchylka (standard deviation)
SDS	dodecylsulfát sodný
SHR	spontánně hypertenzní potkan (spontaneously hypertensive rat)
SHRSP	spontánně hypertenzní potkan se sklonem k mozkovým příhodám (stroke-prone spontaneously hypertensive rat)
SLD	standardní laboratorní dieta (standard laboratory diet)
Smad	small mothers against decapentaplegic

ST-1	kompletní krmná směs pro potkany v SPF (specified pathogen free) chovech
TAG	triacylglyceroly
TBS	izotonický Tris pufr (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TGF- β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UK-LF HK	Lékařská fakulta University Karlovy v Hradci Králové
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol)
17- β -HSD	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenázy
3- β -HSD	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenázy

1. Úvod do problematiky

Během života dochází k neustálé remodelaci kostní tkáně, za kterou zodpovídají buňky kostní novotvorby – osteoblasty, původem z mezenchymálních buněk, a buňky kostní resorpce - osteoklasty, které mají původ v buňkách monocyto - makrofágové linie (McCormick, 2007). Nerovnováha v aktivitě těchto buněk vede ke kostním onemocněním. Za jedno z nejčastějších metabolických onemocnění skeletu se považuje osteoporóza (Poole a Compston, 2006; Raisz, 2005). Osteoporóza (OP) je definovaná podle Světové zdravotnické organizace jako progredující systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem kostní hmoty spojené s poruchou mikroarchitektury kostní tkáně a její zvýšenou náchylností k frakturám (Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis). Fraktury jsou nejčastější v oblasti s vyšším podílem trabekulární kosti tzn. obratle, distální předloktí a proximální část stehenní kosti (Poole a Compston, 2006). Hypercholesterolemie, hypertenze a osteoporóza jsou častá onemocnění u lidí v pokročilém věku. Protože mnoho léků negativně ovlivňuje kostní metabolismus (glukokortikoidy, antiepileptika, heparin a další) vyvstává důležitá otázka, zda léky snižující koncentrace cholesterolu v séru a léky korigující krevní tlak ovlivňují kostní metabolismus, ať již pozitivně či negativně.

1.1 Markery kostního obratu

Kostní metabolismus je nejčastěji sledován stanovením hladin ukazatelů kostního obratu v séru a moči. Ukazatelé kostní remodelace jsou produkty osteoblastů a osteoklastů, které se uvolňují za fyziologických nebo patologických stavů z kostní matrix. Mezi specifické markery kostní novotvory patří kostní izoforma alkalické fosfatázy (BALP), osteokalcin (OC) a N- a C-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, PICP). C- a N- terminální telopeptidy kolagenu I (CTX, NTX) patří mezi ukazatele kostní resorpce. Stanovení kostních markerů podává informaci o rychlosti celotělového kostního obratu - osteoformaci a osteoresorpci, pomáhá tedy při diagnóze onemocnění a informuje o účinnosti léčby.

1.1.1 Kostní izoforma alkalické fosfatázy

Alkalická fosfatáza (ALP) je ubikviterní ektoenzym, který katalyzuje hydrolýzu různých monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. Existují 4 geny kódující izoenzymy – střevní, placentární, embryonální a tkáňově nespecifické (kostní, jaterní a ledvinová izoforma enzymu). Isoformy vznikají posttranslační glykací a sializací. BALP je lokalizována v membránách osteoblastů, ze kterých se při jejich aktivaci uvolňuje do séra. Koreluje s intenzitou kostní novotvorby, účastní se při utváření a mineralizaci osteoidu – zvyšuje lokální koncentraci anorganických fosforečnanů, hydrolyzuje anorganický difosforečnan (pyrofosfát), účinný inhibitor mineralizace kostní tkáně (Brown *et al.*, 2009).

1.1.2 Osteokalcin

Osteokalcin, také nazývaný kostní Gla-protein, představuje hlavní nekolagenní protein v kostní tkáni, který je secernovaný převážně osteoblasty a při novotvorbě kostní tkáně je z části uvolňován do systémové cirkulace. Skládá se ze 49 aminokyselin a obsahuje až 3 zbytky kyseliny γ -karboxyglutamové (GLA), které jsou zodpovědné za vazbu vápenatých iontů. Podílí se tedy na mineralizaci kosti. Tvorba zbytků GLA je katalyzována vitamínem K a stimulována 1,25-dihydroxyvitamínem D. Při nedostatku vitamínu K se tvoří osteokalcin nekarboxylovaný, který je nefunkční. OC má velmi krátký biologický poločas a ledvinami dochází k jeho vylučování. S ohledem na velmi malou velikost jeho molekuly (5,8 kDa) snadno proniká i zdravým glomerulem ledvin. Při renální insuficienci významně stoupá. Při stanovení koncentrace OC v biologickém materiálu je třeba myslet na jeho diurnální rytmus sekrece s nejvyšší koncentrací brzy ráno a na špatnou stabilitu při pokojové teplotě. Hladina OC v séru se pokládá za ukazatele osteoblastické aktivity při různých chorobách kostí a signalizuje zvýšení metabolického kostního obratu (Lee *et al.*, 2000).

1.1.3 Markery kolagenu typu I

Kolagen typu I představuje hlavní součást organické kostní matrix (90 %). Každá molekula kolagenu typu I se skládá z 3 polypeptidových α řetězců, dva α -1 a třetí řetězec α -2, uspořádaných v triplex helixu (Broulík, 1999). Tvorba probíhá v osteoblastech, ze kterých je secernován jako prekurzor prokolagen I. PINP a PICP jsou propeptidy proteolytickými enzymy odštěpeny z prokolagenu I před jeho zabudováním do kostní hmoty ve formě kolagenu I. Jejich sérová koncentrace odráží kostní novotvorbu (Garnero *et al.*, 2008). Naopak při odbourávání kolagenu I působením osteoklastů se uvolňují do systémové cirkulace C-terminální telopeptid kolagenu I (ICTP) účinkem metaloproteináz a C- a N-telopeptidy kolagenu s příčnými vazbami tzv. cross-links (CTX a NTX) vlivem kathepsinu K. Tyto markery vypovídají o resorpci kostní tkáně (Hermann a Seidel, 2008).

1.2 Dvouenergiová rentgenová absorpciometrie

Pro zhodnocení stavu kostní tkáně se především používá dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (DXA, dual energy X-ray absorptiometry), která měří množství kostního minerálu vztažené na plochu stanovované oblasti skeletu (BMD – bone mineral density, g/cm^2). BMD je u pacientů standardně měřena v oblasti bederní páteře (L_1 - L_4) a proximálního femuru. Touto metodou lze měřit jakoukoliv oblast lidského skeletu nebo celotělový obsah minerálu (Palička *et al.*, 2011). Principem této metody je úbytek velmi slabého rentgenového záření (2-12 mikrosievert) o dvou různých energetických hladinách, které je pohlceno kostní tkání při průchodu měřenou oblastí (Broulík, 2007). Užití dvou energií záření umožňuje korigovat vliv měkkých tkání. Zeslabení rtg záření po průchodu kostí je úměrné obsahu minerálu ve tkáni. Výhodou proti jiným metodám je nízká radiační zátěž, vysoká reprodukovatelnost a rychlost vyšetření (Štěpán, 2005). Diagnostický závěr je založen na srovnání změřené kostní hustoty s maximálním obsahem BMD v mladém věku. Odchylka od této hodnoty, vyjádřená v počtu standardních odchylek (SD, standard deviation) je označována jako T skóre. U dětí a mladistvých a osob starších 70 let je hodnotícím

kritériem hodnota Z skóre, které udává počet standardních odchylek od průměrné hodnoty osob stejného věku a pohlaví. Opakované vyšetření BMD v časových intervalech dává informace o rychlosti změny množství kostního minerálu v hodnocené oblasti skeletu a informuje o účinnosti léčby. Měření signifikantní změny množství kostního minerálu ve specifických místech skeletu s ohledem na přesnost měření lze detekovat nejdříve v ročních odstupech (Palička *et al.*, 2011).

Tabulka 1: Rozdělení dle WHO podle naměřených hodnot BMD.

BMD (bone mineral density) – hustota kostního minerálu; SD (standard deviation) – standardní odchylka

1.3 Regulace remodelace kostní tkáně

1.3.1 Androgeny

Osteoporózou trpí nejen ženy, ale často opomíjení v tomto ohledu i muži. Vlivem stárnutí dochází k poklesu pohlavních hormonů a u mužů je to především testosteron, který je velmi důležitý pro kostní tkáň. Snížením hladiny sexuálních hormonů dochází k zvýšenému kostnímu obratu s následným snížením hustoty kostního minerálu a poruchou mikroarchitektury kostní tkáně (jak trabekulární, tak kortikální) a s tím spojený vznik křehčích kostí vedoucí ke vzniku fraktur (Alexandre, 2005).

Androgenní hormony jsou považovány za významné regulátory růstu a maturace skeletu u obou pohlaví. Pokles sexuálních hormonů v období menopauzy a andropauzy vede k úbytku celkové kostní hmoty (Callewaert *et al.*, 2009).

Androgeny, C-19 steroidy, jsou secernovány Leydigovými buňkami varlete u mužů a kůrou nadledvin u mužů i žen. Testosteron, nejhojnější cirkulující androgen u mužů, přímo působí přes androgenní receptor (AR).

Lokalizace androgenních receptorů v kostní tkáni (upraveno dle Orwoll, 2001).

- aktivní osteoblasty v místě novotvorby kostní matrix

-
- osteocyty
 - stromální buňky odvozené z kostní dřeně
 - místa kortikální a intramembranózní (desmogenní) tvorby kostní matrix
 - chondrocyty epifýz
 - mononukleární buňky kostní dřeně a buňky cévního endotelu
 - osteoklasty
-

Testosteron se přeměňuje v periferních tkáních (skelet) na účinnější androgen, 5- α -dihydrotestosteron, působením 5 α -reduktázy. Také může být konvertován na 17 β -estradiol pomocí P450 aromatázy, která je přítomná též v kostní tkáni, a následně aktivovat estrogenní receptory- α a β (ER α a ER β) (Callewaert *et al.*, 2009). Polymorfismus genu pro aromatázu je spojován s pozitivním vlivem na objem kortikální kosti u mladých mužů (Lorentzon *et al.*, 2006). V kůře nadledvin vznikají slabší androgeny – androstendion a dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfát, které slouží jako substrát pro vznik estronu pomocí aromatázy a testosteronu pomocí steroidní sulfatázy, 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenázy (17- β -HSD) a/nebo 3- β -HSD v periférii. Tudíž androgeny mohou aktivovat androgenní nebo estrogenní receptory v závislosti na aktivitě těchto enzymů, které jsou exprimovány v kostní tkáni (Callewaert *et al.*, 2009).

Testosteron je velmi důležitý pro správnou funkci kostního metabolismu. Cestou aktivace receptorů na osteoblastech zprostředkovává proliferaci a diferenciaci osteoblastů, produkci růstových faktorů, cytokinů (transformující růstový faktor beta; TGF- β), snížení sekrece interleukinu 6 a prostagandinu E₂ (Clarke a Khosla, 2009). Androgeny jsou zodpovědné za prodlužování kostí přímým účinkem na chondrocyty růstových plotének. Injekčně podaný testosteron přímo do růstových plotének u potkanů navozuje jejich proliferaci a zvětšení (Ren *et al.*, 1989). Tento fakt naznačuje, že se androgeny s růstovým hormonem podílejí na urychlení lineárního prodlužování kostí během puberty. Androgenní receptory jsou v tomto období tedy zodpovědné za prodlužování kostí a zvětšování objemu kostní hmoty. Na druhé straně, estrogen se podílí na následném uzavření epifýzy a ukončení růstu skeletu (Paduch *et al.*, 2008).

Obrázek 1: Odlišná regulace růstu a udržení mužského skeletu sexuálními hormony (upraveno dle Callewaert *et al.*, 2009).

Schéma objasňuje rozdílné působení testosteronu a androgenních receptorů (AR) nebo 17 β -estradiolu a estrogenních receptorů (ER α a ER β) na (1) longitudinální růst kosti (modrá), (2) kost trabekulární (oranžová) a (3) kost kortikální (zelená).

0 žádný vliv; ++ dominantní stimulační efekt; + stimulační vliv; + (IGF-1) stimulační vliv, který by mohl být (částečně) zprostředkovaný inzulinu podobným růstovým faktorem 1; ~ rozporuplný nebo nejistý vliv

Po 3 měsících od provedené orchidektomie u myši bylo pozorováno snížení kostní denzity a pokles obsahu minerálů – vápníku a fosforu v kostní tkáni (Broulík a Broulíková, 2007). Studie provedené na potkanech po orchidektomii ukazují, že deficece androgenů negativně ovlivňuje stavbu těla snížením celkové hmotnosti, tukuprosté tělesné hmoty, minerální denzity kostí a nárůstem tělesného tuku (Vanderschueren *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2010). Potkan po provedené orchidektomii je v současné době považován za vhodný zvířecí model mužského hypogonadismu a následně se vyvíjející osteoporózy (Wink *et al.*, 1980; Verhas *et al.*, 1986).

1.3.2 Insulinu podobný růstový faktor (IGF-1; Insulin like Growth Factor 1)

V játrech je insulinu podobný růstový faktor tvořen pod vlivem růstového hormonu. IGF-1 je syntetizován mnoha tkáněmi včetně skeletu (růstový faktor produkovaný osteoblasty). IGF-1 je systémovým i lokálním regulátorem, který může ovlivnit proces kostní formace. Terapie glukokortikoidy a 1,25-dihydroxy vitaminem D₃ jeho syntézu inhibují (Kasukawa *et al.*, 2004). Jeho expresi v osteoblastech stimuluje parathormon (PTH) a estradiol (Ernst a Rodan, 1991). IGF-1 se účastní jak kostní novotvorby, tak kostní resorpce stimulací osteoformace v odpovědi na osteoresorpci (Swarthout *et al.*, 2002). Stimuluje proliferaci a diferenciaci osteoblastů, syntézu kostní matrix a kolagenu. IGF-1 také indukuje tvorbu interleukinu 6 (IL-6) a ligandu pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (RANKL) v osteoblastech, čímž stimuluje tvorbu osteoklastů a následnou osteoresorpci (Ueland, 2005). IGF-1 pozitivně působí na růst kosti do délky i do šířky a zvyšuje utváření jak její části kortikální, tak trabekulární. Po vazbě na specifické receptory v ledvinných buňkách tubulů aktivuje produkci 1,25-dihydroxycholecalciferolu (kalcitriolu; 1,25(OH)₂D₃) a reabsorpci anorganického fosfátu (Pi). Zvýšením produkce kalcitriolu nepřímo stimuluje intestinální absorpci

kalcia a Pi. Oba tyto mechanismy zvyšují množství minerálu v kosti (Bonjour *et al.*, 2009).

1.3.3 Kostní morfogenetické proteiny (BMP)

Kostní morfogenetické proteiny byly poprvé identifikovány v roce 1965 (Urist, 1965) jako faktory zodpovědné za ektopickou osifikaci svalové tkáně. Patří do nadrodiny růstových faktorů TGF- β (Transforming Growth Factor β), podporují diferenciaci mezenchymálních buněk v chondrocyty a osteoblasty a dále osteoprogenitorových buněk v osteoblasty. BMP-2, BMP-4 a BMP-7 hrají hlavní roli v hojení zlomenin (Lieberman *et al.*, 2002). Kostní morfogenetické proteiny zvyšují expresi ALP, PTH, protein podobný parathormonu (PTHrP), kolagenu I a osteokalcinu *in vitro* (Yamaguchi *et al.*, 1991). BMP působí přes serin/treonin kinázové receptory typu I (BMPR-1A a BMPR-1B) a II. Kostní morfogenetické proteiny se nejprve navážou na receptor typu II, následně dojde k fosforylaci a poté k aktivaci receptoru typu I. Po navázání BMP na receptor typu I dochází k fosforylaci transkripčních faktorů Smad1/Smad5/Smad8, které spolu se Smad4 vytváří komplex. Tento komplex se translokuje do jádra buňky, kde navozuje transkripci cílových genů (Katagiri a Takahashi, 2002). Tato signální dráha může být inhibována proteinem Smad6 (Yamaguchi *et al.*, 2008).

Obrázek 2: BMP signalizace prostřednictvím BMP receptorů a Smad (upraveno dle Yamaguchi *et al.*, 2008).

1.3.4 RANK/RANKL/OPG

Diferenciaci a aktivitu osteoklastů zprostředkovávají samy osteoblasty. Osteoblasty exprimují na svém povrchu ligand vázající se na receptor, aktivující nukleární faktor kappa B (RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa B ligand). RANKL je také produkován stromálními kmenovými buňkami, fibroblasty a aktivovanými T-lymfocyty. Stimulátory kostní resorpce např. parathormon, 1,25-dihydroxyvitamin D a prostaglandiny zvyšují produkci RANKL osteoblasty a tím

indukují diferenciaci osteoklastů nepřímou cestou (Adam *et al.*, 2005). Navázáním RANKL na receptor aktivující nukleární faktor kappa B (RANK – receptor activator of nuclear factor kappa B) dojde k aktivaci osteoklastů. RANK je transmembránovým receptorem na prekurzorech osteoklastů a na zralých osteoklastech. Interakci RANK/RANKL blokuje solubilní receptor osteoprotegerin (OPG), který je produkován stromálními buňkami a osteoblasty. OPG tedy funguje jako tzv. "lákající," receptor vyvazující volný RANKL a blokuje tak RANK receptor v membráně osteoklastů a tím dochází k inhibici osteoklastogeneze (Pivonka *et al.*, 2010). Za fyziologických podmínek je poměr mezi OPG a RANKL v rovnováze. Za patofyziologického stavu např. u postmenopauzální osteoporózy dochází k snížení hladiny estrogenů, který je stimulatorem exprese OPG. U postmenopauzální osteoporózy tedy dochází k poklesu hladin OPG a k zvýšení exprese RANKL, který pak vazbou na receptor RANK na osteoblastech stimuluje jejich diferenciaci a inhibuje jejich apoptózu (Pfeilschifter *et al.*, 2002).

Obrázek 3: Komunikace mezi osteoblasty a osteoklasty cestou RANK/RANKL/OPG (upraveno dle de Villiers, 2009).

1.4 Vliv arteriální hypertenze na kostní metabolismus

Arteriální hypertenze a osteoporóza jsou dvě častá onemocnění ve vyšších věkových skupinách. Obě jsou vyvolaná interakcí mnoha genetických a enviromentálních faktorů (Shimizu *et al.*, 2008). Studie prováděné na zvířatech a klinické studie naznačují, že vysoký krevní tlak je spojován s abnormalitami v metabolismu vápníku vedoucí k jeho ztrátám močí, sekundárně k nárůstu produkce parathormonu a k zvýšenému uvolňování vápníku z kosti, což zvyšuje riziko vzniku osteoporózy (Hvarfner *et al.*, 1987; Izawa *et al.*, 1985; McCarron *et al.*, 1980; Tsuda *et al.*, 2001; Gotoh *et al.*, 2001). Mnohé studie ukazují, že vysoký krevní tlak je spojován

s poklesem BMD (Cappuccio *et al.*, 1999; Izawa *et al.*, 1985). Práce Cappuccia *et al.* (1999) uvádí, že vysoký krevní tlak u starších žen bílé rasy je spojován se zvýšenou ztrátou kostní hmoty krčku femuru, což by mohlo být způsobeno negativním vlivem hypertenze na metabolismus vápníku. To vše by mohlo vést k zvýšenému riziku vzniku fraktur.

1.5 Vliv hypercholesterolémie na kostní metabolismus

Hypercholesterolémie i dyslipidémie mají negativní efekt na kostní tkáň (Tintut *et al.*, 2002; Tintut *et al.*, 2004; Parhami *et al.*, 2001). Tintut *et al.* (2002) zjistili, že aterogenní lipidy *in vitro* inhibují diferenciaci osteoblastů. Hypercholesterolémie u myši podporuje diferenciaci osteoklastů (Tintut *et al.*, 2004) a snižuje BMD (Parhami *et al.*, 2001). U žen po menopauze s profilem aterogenních lipidů našli Orozco *et al.* (2004) sníženou BMD v oblasti bederních obratlů a femuru. V longitudinální studii prezentovali Tankó *et al.* (2003), že postmenopauzální ženy (50-75 let) s největším zvýšením sérového cholesterolu měly nejvýraznější pokles BMD v oblasti bederních obratlů nezávisle na změně jejich BMI (body mass index). Majima *et al.* (2008) zjistili u pacientů s hypercholesterolémií nárůst sérové koncentrace NTX u žen i mužů a BALP pouze u žen. Jak BALP tak NTX u mužů negativně korelovaly s HDL-CHOL (high-density lipoprotein HDL), u žen pozitivně s celkovým cholesterolem (CHOL) a LDL-CHOL (low-density lipoprotein LDL). Výsledky z literatury naznačují zvýšený kostní obrat u pacientů jak s hypercholesterolémií, tak s dislipidémií bez ohledu na pohlaví.

1.6 Potkan jako experimentální model v osteologii

Experimenty *in vivo*, ale také *in vitro* se provádějí především na zvířecích modelech. Jedním z nejčastěji užívaných zvířat v experimentální osteologii je potkan. K objasnění patogeneze kostní ztráty indukované deficiencí androgenů a hledání nových léčebných možností k zabránění úbytku kostní hmoty jsou potřebné a velmi cenné zvířecí modely. Po odstranění pohlavních endokrinních žláz dochází k poklesu koncentrací pohlavních hormonů, které jsou velmi důležité pro správný růst, formování a remodelaci kostí. K snížené či chybějící tvorbě hormonů dochází v průběhu fyziologického procesu stárnutí nebo při některých patologických stavech.

Hypogonadismus představuje jeden z hlavních rizikových faktorů pro vznik osteopenie a osteoporózy u mužů (Paduch *et al.*, 2008). Potkani mužského pohlaví dosáhnou maximální kostní hmoty (PBM; peak bone mass) přibližně ve 12 měsíci. Orchidektomie provedená u potkanů v období růstu má negativní dopad na stavbu těla. Vede k inhibici nárůstu tělesné hmotnosti, svalové hmoty a kortikální a trabekulární kostní hmoty, také má za následek dosažení menší maximální PBM v porovnání s intaktními potkany (Ke *et al.*, 2001).

Potkan po provedené orchidektomii je v současné době považován za vhodný zvířecí model pro studium mužského hypogonadismu, osteopenie a osteoporózy (Wink *et al.*, 1980; Verhas *et al.*, 1986; Erben, 2001; Ke *et al.*, 2001; Bagi *et al.*, 2011).

Spontánně hypertenzní potkan kmene SHR je nejčastěji používaný experimentální model esenciální hypertenze a jeví se být vhodným modelem osteoporózy. U SHR potkanů byl totiž pozorován pokles kortikální a spongiózní kostní hmoty a zvýšený kostní obrat v porovnání s Wistar-Kyoto potkany sloužící jako jejich normotenzní kontrola (Sato *et al.*, 2010).

1.7 Léčiva ze skupiny hypercholesterolemik a antihypertenziv

Byla vybrána léčiva, která jsou často předepisovaná pacientům s kardiovaskulárním onemocněním, o kterých neexistuje dostatek informací souvisejících s kostním metabolismem, nebo jsou informace zatím nejednotné.

1.7.1 Ezetimib

Ezetimib je hypolipidemikum ze skupiny selektivních inhibitorů absorpce cholesterolu (CHOL) v kartáčovém lemu buněk střevní mukózy (Rudel, 2002). Zabraňuje vstřebávání cholesterolu z potravy a žluče ze střevního lumen do enterocytů bloádou transportního proteinu Niemann - Pick C1 like protein 1 (NPC1L1) (Altmann *et al.*, 2004; Shepherd, 2004; Kramer *et al.*, 2000). Transportní protein je zejména přítomen v duodenu a v proximální části tenkého střeva, kde dochází k maximálnímu vstřebávání CHOL (Altmann *et al.*, 2004). Ezetimib neovlivňuje absorpci TAG (triacylglycerolů), mastných kyselin, žlučových kyselin, progesteronu, etinylestradiolu

(syntetického derivátu estradiolu) a vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K) (van Heek *et al.*, 2001), což je výhodné pro kostní metabolismus. Estrogenní hormony, vitaminy D a K mají důležitou úlohu v řízení kostního metabolismu. Účastní se na novotvorbě kostní tkáně. Ezetimib významně snižuje plazmatické hladiny LDL-CHOL a zvyšuje HDL-CHOL, v menší míře také snižuje TAG u pacientů s hypercholesterolémií (Jeu a Cheng, 2003). Pod vlivem ezetimibu dochází ke snížení nabídky cholesterolu játrům s následným zvýšením exprese LDL-receptorů a zvýšením vychytávání částic LDL z plazmy (Rudel, 2002). Ezetimib vstupuje do enterocytů, kde dochází k jeho glukuronidaci na aktivní metabolit. Ten vstupuje portálním oběhem do jater a žlučí je zpětně secernován do střevního lumen, kde se váže na kartáčový lem enterocytů (van Heek *et al.*, 2000). Po absorpci v cévní stěně se hydrolyzuje a je zpět vyloučen do lumen střeva a celý cyklus se opakuje. Tento enterohepatální oběh zajišťuje vysokou koncentraci a dlouhodobé působení ezetimibu i jeho metabolitu (Bultas, 2004). Studie na zvířatech potvrdily, že glukuronovaný derivát je účinnější inhibitor absorpce CHOL, než samotný ezetimib (van Heek *et al.*, 2000).

Snížená absorpce cholesterolu ve střevě má však za následek zvýšenou endogenní syntézu cholesterolu v játrech prostřednictvím reductázy 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A (HMG-CoA reductáza). Z tohoto důvodu je výhodné ezetimib kombinovat se statiny (inhibitory HMG-CoA reductázy), které endogenní syntézu CHOL inhibují (Rudel *et al.*, 2002). Ezetimib podávaný spolu se statinem je indikován k terapii u pacientů s primární hypercholesterolémií (heterozygotní familiární nebo nefamiliární) a homozygotní familiární hypercholesterolémií. V monoterapii pacientům, u kterých není podávání statinu vhodné a dále u homozygotní sitosterolémie nebo u primární hypercholesterolémie (Jeu a Cheng, 2003).

Po tříměsíčním podávání ezetimibu (10 mg/den) pacientům s diagnostikovanou hypercholesterolémií a s *diabetes mellitus* 2. typu nedošlo k statisticky významné změně v sérových koncentracích ukazatelů kostního obratu (Kanazawa *et al.*, 2009). Sertbas *et al.* (2010) zkoumali vliv ezetimibu podávaném ve stejné dávce (10 mg/den) u pacientů s hypercholesterolémií na kostní metabolismus po roce podávání. Byla změřena BMD bederních obratlů a femuru a sérové koncentrace celkového

cholesterolu, TAG, LDL, vápníku, fosforu, BALP a beta-CTX před nasazením ezetimibu a po roce léčení. Po ročním užívání prokázali nevýznamné zvýšení BALP a beta-CTX a statisticky nevýznamné zvýšení BMD v měřených oblastech. Lze předpokládat, že ezetimib výrazně nezasahuje do kostního metabolismu u lidí.

1.7.2 Atorvastatin

Atorvastatin patří do skupiny statinů, které jsou považovány za jedny z nejúčinnějších hypocholesterolemik. Kromě schopnosti snižování cholesterolémie byly u statinů prokázány tzv. pleiotropní účinky, mezi které patří zlepšení endoteliální dysfunkce, snížení zánětlivé odpovědi, stabilizace aterosklerotického plátu a snížení formace trombů (Liao, 2002). Navíc bylo publikováno mnoho studií prokazujících především pozitivní účinky statinů na kostní tkáň (Jadhav a Jain, 2006).

Atorvastatin inhibuje enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázu při syntéze cholesterolu. Inhibicí enzymu dochází k snížení přeměny HMG-CoA na mevalonovou kyselinu (mevalonát) a následných izoprenoidních prekurzorů lipidů. Inhibicí enzymu dochází ke snížení syntézy cholesterolu především v jaterních buňkách (Stern *et al.*, 2000). Snížení dostupnosti cholesterolu vede především ke zvýšení syntézy jaterních LDL-receptorů a ke zvýšenému odstraňování LDL-částic z krevního oběhu. Dochází tedy k poklesu celkového i LDL-cholesterolu a triglyceridů a k zvýšení hladiny HDL-cholesterolu v krvi (Malhotra a Goa, 2001).

Mevalonát je dále konvertován na geranylpyrofosfát, který je přeměněn na farnesylpyrofosfát enzymem farnesylpyrofosfát syntázou, skvalen a výsledně cholesterol (obr. 3). Farnesylpyrofosfát syntetáza je blokována bisfosfonáty, které jsou již mnoho let úspěšně používané v léčbě osteoporózy. Statiny a bisfosfonáty tedy inhibují stejnou biochemickou cestu endogenní syntézy cholesterolu (obr. 3).

Již zmiňované izoprenoidní prekurzory, mezi které patří hlavně farnesylpyrofosfát a geranylgeranylpyrofosfát jsou velice důležité pro posttranslační modifikaci (prenylaci) GTP-vázajících proteinů (jinak také nazývaných malé GTPázy) – Rho, Rac a Rab. Tyto proteiny jsou aktivovány po prenylaci a účastní se různých transdukčních dějů jako například utváření cytoskeletu. Prenylace umožňuje připojení malých GTPáz na cytoplazmatickou membránu osteoklastů. Tento krok je potřebný pro

správnou tvorbu resorpční kartáčové zóny osteoklastů sloužící k připevnění ke kostnímu povrchu a dále k následnému uvolnění vezikul s proteolytickými enzymy a kyselinami do prostoru utěsněného osteoklasty. Nedostatek meziproductů syntézy cholesterolu účinkem statinů způsobuje tedy apoptózu osteoklastů a následné snížení resorpce kostní tkáně (Coxon a Rogers, 2003).

Obrázek 4: Ovlivnění biosyntetické dráhy cholesterolu statiny a aminobisfosfonáty (upraveno dle Jadhav a Jain, 2006).

Další z faktorů, který ovlivňuje kostní tkáň je kostní morfogenetický protein 2 (BMP-2), který umožňuje zvýšení exprese a diferenciaci osteoblastů a následné zvýšení kostní novotvorby (Mundy *et al.*, 1999). Mundy *et al.* (1999) jako první prezentovali, že v tkáňových kulturách kostních buněk se zvyšuje exprese BMP-2 vlivem statinů. Statiny - lovastatin, simvastatin, fluvastatin a také atorvastatin v tkáňových kulturách zvyšují počet osteoblastů a novotvorbu kostní tkáně 2-3násobně pravděpodobně indukcí BMP-2 (Jadhav a Jain, 2006).

Dále bylo zjištěno, že atorvastatin zvyšuje *in vitro* expresi dalších ukazatelů diferenciaci osteoblastů, kostní formu izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a osteokalcin (OC), kolagenu I, osteoprotegerinu (OPG) (Viereck *et al.*, 2005; Ruiz-Gaspa *et al.*, 2007).

Atorvastatin také stimuluje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje diferenciaci osteoblastů, potlačením prenylace proteinů a aktivací signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (Maeda *et al.*, 2003).

Osteoporóza a ateroskleróza jsou častá onemocnění u populace starších lidí. Pacientům s kardiovaskulárním onemocněním je nutné podávat léky např. na snížení vysokého krevního tlaku či cholesterolu, ale vedlejším efektem této léčby může být ovlivnění kostního metabolismu. V lepším případě pozitivně, ale pro klinickou praxi je především nutné vědět, zda tato terapie nepodpoří fyziologický úbytek kostní hmoty, ke kterému s věkem narůstajícím dochází.

Převážná většina publikovaných prací naznačuje, že statiny mají prospěšný vliv na kostní tkáň *in vitro*. Studie s buněčnými kulturami osteoblastů ovlivněných statiny ukazují, že dochází ke stimulaci kostní novotvorby, která je zprostředkována zvýšením

exprese kostního morfogenetického proteinu (BMP-2). Statiny ale vykazují jiné účinky *in vitro* než v *in vivo* experimentech, ve kterých spíše převažuje antiresorpční účinek (Jadhav a Jain, 2006). Práce pocházející od Maritze *et al.* (2001) se s tímto tvrzením neztotožňuje. Maritz *et al.* (2001) prokázali statisticky významné snížení ($p=0,0002$) BMD femuru u kastrovaných samic potkanů kmene Sprague-Dawley, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 0,25 mg/100g BW po dobu 12 týdnů.

Bylo prezentováno několik studií, ve kterých je naznačováno, že hypercholesterolemie a osteoporóza mohou spolu souviset (Parhami *et al.*, 1999; Tintut *et al.*, 2002; Tintut *et al.*, 2004; Majima *et al.*, 2007; Majima *et al.*, 2008). Hypercholesterolemie stimuluje diferenciaci osteoklastů a resorpční aktivitu jak *in vivo* (Tintut *et al.*, 2004), tak *in vitro* (Tintut *et al.*, 2002). Majima *et al.* (2008) ve své práci zjistili, že muži s hypercholesterolemií mají signifikantně vyšší sérovou hladinu NTX a ženy pouze BALP v porovnání s kontrolními skupinami, což svědčí o zvýšeném kostním obratu. Majima *et al.* (2007) sledovali vliv atorvastatinu u mužů s hypercholesterolemií na metabolický kostní obrat. Po 3 měsících léčby statinem došlo k signifikantnímu snížení NTX. Na druhé straně *in vitro* studie ukazují, že oxidační produkty lipidů a lipoproteinů (8-iso Prostaglandin E2, mírně oxidované LDL) inhibují diferenciaci a funkci osteoblastů a aktivují osteoklasty (Tintut *et al.*, 2002; Parhami *et al.*, 1999).

1.7.3 Amlodipin

Amlodipin je derivátem dihydropyridinu a patří do skupiny blokátorů kalciových kanálů 3. generace, je výrazně lipofilní a má výraznou vasodilatační aktivitu s dlouhodobým účinkem. Amlodipin je indikován v léčbě hypertenze, vazospastické a chronické stabilní anginy pectoris (Devabhaktuni a Bangalore, 2009). Jeho hlavním účinkem je inhibice průniku iontů Ca^{2+} přes napětově řízené pomalé L-kalciové kanály v buněčné membráně. Tím dochází ke snížení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} a k následné relaxaci hladkých svalových buněk v periferních a koronárních cévách (Devabhaktuni a Bangalore, 2009). Deriváty dihydropyridinu jsou důležité pro prevenci

kardiovaskulárních onemocnění a to jak snížením krevního tlaku, tak také antioxidačními účinky na endotel cév, které byly prokázány v experimentech *in vitro* (Civantos a Alexandre, 2004; Rosenkranz *et al.*, 2006).

Osteoblasty, pocházející z nediferencovaných mezenchymálních buněk dřevnatého stromatu, mají hlavní roli v tvorbě kostní hmoty a v dotváření mineralizované kosti. Během své aktivace exprimují kolagen typu I, kostní formu izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a osteokalcin (OC). Bylo prokázáno, že osteoblasty také exprimují napěťové kalciové kanály (Duncan *et al.*, 1998). Kalciový kanál L-typu byl objeven i na potkaních osteoblast-like buňkách (Morain *et al.*, 1992). Vysokovoltážově aktivovaný kanál L-typu představuje spojení pěti různých podjednotek ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ a δ). Dihydropyridiny se váží na $\alpha 1$ podjednotku napěťového kalciového kanálu (Halici *et al.*, 2008). Některé regulátory kostního metabolismu, vitamín D₃, parathormon a prostaglandin E₂, způsobují zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů v osteoblastech, které byly účinkem dihydropyridinů sníženy (Lieberherr, 1987). Tyto faktory podporují nebo inhibují diferenciaci osteoblastů (Kurihara *et al.*, 1986; Nakatani *et al.*, 1984). Některé regulátory kostní novotvorby (parathormon, 17 β -estradiol) též ovlivňují expresi kanálů L-typu a jejich funkční zapojení do kostní remodelace (Gu *et al.*, 2001). Během diferenciaci kostních mezenchymálních buněk lidské kostní dřevě by mohly být kalciové kanály cílem pro farmakologickou regulaci tohoto procesu (Zahanich *et al.*, 2005). Tato skutečnost ukazuje na důležitou roli kalciových kanálů v regulaci funkce osteoblastů a kostního metabolismu.

Mnohé práce naznačují, že blokátory kalciového kanálu ovlivňují kostní metabolismus, ale dosud neexistuje jednotný názor, zda jsou prospěšné či nikoliv. Většina studií prokázala spíše pozitivní vliv na kostní tkáň vedoucí k snížení kostní resorpce, kostní minerální hustoty a rizika fraktur (Rejnmark *et al.*, 2006; Ritchie *et al.*, 1994; Ushijima *et al.*, 2010).

Informací o vlivu amlodipinu na kostní metabolismus je prozatím velmi málo a jsou rozporuplné (Nishiya a Sugimoto, 2001; Halici *et al.*, 2008; Ushijima *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2011).

Halici *et al.* (2008) zjistili pomocí rentgenové fluorescenční spektrometrie u kastrovaných samic potkanů kmene Wistar, kterým byl podáván amlodipin v dávce 1 a 3 mg/kg BW po dobu 8 týdnů, signifikantní nárůst koncentrace kalcia a fosforu ve stehenní kosti.

Ushijima *et al.* (2010) podávali samcům „stroke-prone“ spontánně hypertenzních potkanům, kteří mají sklon k mozkovým příhodám (SHRSP) amlodipin v dávce 3 mg/kg BW po dobu 3 měsíců a prokázali statisticky významný nárůst BMD femuru a signifikantní pokles sérových koncentrací vápníku, PTH a CTX. Autoři se domnívají, že amlodipin působí přímo inhibicí osteoklastů anebo potlačuje sekreci PTH s následnou inhibicí osteoklastické aktivity.

Moreas *et al.* (2011) zjistili statisticky významný pokles alkalické fosfatázy v séru po 1, 7 a 14 dnech podávání amlodipinu v denní dávce 0,04 mg samcům potkanů kmene Wistar.

V experimentech bylo také prokázáno, že amlodipin snižuje hladinu plazmatického testosteronu u samců potkanů kmene Wistar (Almeida *et al.*, 2000; Onwuka *et al.*, 2010). Vzhledem k důležitosti testosteronu pro správnou funkci kostního metabolismu lze podle těchto zjištění očekávat naopak negativní vliv amlodipinu na kostní tkáň.

1.7.4 Metoprolol

Mezi antihypertenziva patří kromě jiných β -blokátory. Mechanismus účinku snižování krevního tlaku spočívá v tom, že β -blokátory snižují srdeční výdej v důsledku blokády srdečních β_1 -receptorů. Následkem je pokles srdeční frekvence a snížení kontraktility myokardu, což vede ke snížení nároků myokardu na kyslík. Proto β -blokátory mají současně antiarytmický a antiangiózní účinek (Vítovec *et al.*, 2004).

Obrázek 5: Chemický strukturní vzorec metoprololu
(vytvořeno programem ACD/ChemSketch, ver. 9; Advanced Chemistry Development, Inc.)

Metoprolol je lipofilní β_1 -selektivní blokátor adrenergických receptorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity a zmírňuje účinky zvýšené sympatomimetické aktivity na srdce. Kardioselektivita metoprololu je nesespecifická, závisí na poměru afinity účinné látky k oběma typům receptorů (Vítovec *et al.*, 2004). Metoprolol až při vyšších

dávkách blokuje β_2 receptory (Vítovec *et al.*, 2004), které byly také identifikovány na buňkách osteoblastů a osteoklastů (Moore *et al.*, 1993; Takeda *et al.*, 2002). Aktivací sympatického nervového systému, ve kterém hraje roli hormon leptin, dochází k produkci noradrenalinu v kostech, který se váže na β_2 -receptory osteoblastů a tím inhibuje jejich aktivitu (Takeda *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2008). Navíc, stimulací β_2 -receptorů dochází k produkci ligandu pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (RANKL) osteoblasty, to může vést k aktivaci osteoklastů a tím zvýšené kostní resorpci (Bonnet *et al.*, 2008). Výskyt těchto receptorů na buňkách kostní tkáně naznačuje, že by mohl metoprolol podávaný pacientům ve vyšších dávkách zasahovat pozitivně do kostního metabolismu cestou jejich blokády.

O vlivu metoprololu na kostní metabolismus se zatím mnoho neví (Rejnmark *et al.*, 2004; Schlienger *et al.*, 2004) a dosavadní data o β -blokátorech a jejich vlivu na kostní metabolismus jsou nejednotná. Většina dosavadních studií uvádějí, že užívání β -blokátorů zlepšuje hustotu kostního minerálu (Pasco *et al.*, 2004; Turker *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011) a snižuje riziko zlomenin (Pasco *et al.*, 2004; Schlienger *et al.*, 2004; Rejnmark *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007; Meisinger *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011), ale ne všechny studie se s tímto zjištěním ztotožňují (Rejnmark *et al.*, 2004).

Rejnmark *et al.* (2004) zjistili, že perimenopauzální ženy léčené β -blokátory, mezi kterými byl zahrnut i metoprolol, měly trojnásobné riziko vzniku fraktury a o 20 % nižší sérový osteokalcin v porovnání s neléčenými ženami.

Schlienger *et al.* (2004) uvádějí ve své observační studii (case-control study), že β -blokátory samotné nebo v kombinaci s thiazidovými diuretiky snižují riziko zlomeniny u lidí s incidencí fraktury ve středním a pokročilém věku.

2 Cíle disertační práce

Cílem mé disertační práce bylo zjištění vlivu a doplnění poznatků o vybraných, často předepisovaných, léčivech ze skupiny antihypertenziv (amlodipin, metoprolol) a hypolipidemik (ezetimib, atorvastatin) na kostní metabolismus u potkanů.

Konkrétní cíle:

1. Zjištění vlivu léků na hladinu kostních markerů:
 - stanovení koncentrace kostních markerů v séru
 - zavedení metody přípravy homogenátů z kostní tkáně
 - zavedení stanovení množství kostních markerů v kostních homogenátech metodou Western blot a ELISA (Enzyme-Like ImmunoSorbent Assay)
 - stanovení koncentrace celkového vápníku v séru v tibiai

2. Zjištění vlivu léků na kostní minerální hustotu:
 - změření kostní minerální hustoty (BMD) potkana pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie
 - preparace femurů z potkana *post mortem* a zavedení metody měření BMD samotných femurů
 - vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné svalové a tukové tkáně) potkana a také vyhodnocování BMD samotných femurů

3. Zjištění vlivu léku na mechanické vlastnosti kostní tkáně:
 - podílení se na zavedení metodiky testování mechanických vlastností kostní tkáně femurů

3 Experimentální část

Vzhledem k nedostatku studií o vlivu léčiv ze skupiny antihypertenziv (amlodipin, metoprolol) a hypolipidemik (ezetimib, atorvastatin) na kostní metabolismus, nebo nejednotnosti sdělení, nelze s jistotou tvrdit, zda jejich vliv je pozitivní či negativní. Pro mou disertační práci jsem si zvolila léčiva, která jsou často předepisovaná pacientům s vysokým krevním tlakem a s vysokou hladinou cholesterolu. Proto jsem se rozhodla pro další studium vlivu zmiňovaných léčiv na kostní metabolismus, abych přinesla nové poznatky v této problematice.

Experimenty byly provedeny u zdravých samců potkanů kmene Wistar ve vývinu, u kterých bylo možno sledovat vliv samotného léku na jejich kostní tkáň. Reaktivita kostní hmoty u těchto zvířat nebyla modifikována ani absencí pohlavních hormonů, a ani přidruženými chorobami (obezita, dyslipidémie nebo arteriální hypertenze). Dále byli použiti potkani kmene Wistar a spontánně hypertenzní potkani, kterým byla provedena orchidektomie k navození poruchy kostního metabolismu vedoucí k zvýšení kostního obratu s poklesem hustoty kostního minerálu a změnou mechanických vlastností kostí.

3.1 Experimentální zvířata

Potkani byli ustájeni v Centrálním viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (UK-LF HK). Protokoly všech pokusů byly schváleny Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání UK-LF HK (č. j. 2709/2009-30, 22106/2010-30, 21544/2011-30). Všechny experimenty byly provedeny v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. V realizovaných experimentech byli použiti samci potkanů kmene Wistar (Biotest s.r.o., Konárovice, Česká Republika) a spontánně hypertenzní potkani (SHR; Spontaneously Hypertensive Rat; AnLab, s.r.o., Praha, Česká Republika). Potkani byli umístěni po 4 v plastových klecích na dřevěných prachuprostých hoblinách a chováni za standardních podmínek (klimatizované prostory, 12 výměn kubatury místnosti za 1 hodinu, teplota vzduchu 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %, světelný režim 12 hodin světlo a 12 hodin

tma). Zvířata byla krmena standardní laboratorní dietou (SLD; ST-1, VELAS, a.s., Lysá nad Labem, Česká Republika) a pitnou vodou *ad libitum*. Léky byly podávány v podobě suspenze v případě prvního experimentu, v 2. a 3. studii byly léky přidávány do SLD a potkanům podávány ve formě připravených pelet. V průběhu pokusů byla sledována váha potkanů a pravidelně zaznamenávána hmotnost spotřebovaných pelet a vypité vody pro informaci, zda potkani léky dobře snášejí a zda přibývají postupně na váze.

3.2 Podávané léky

antihypertenziva

- amlodipin (Cardilopin, EGIS PHARMACEUTICALS PLC, Budapešť, Maďarsko)
- metoprolol (Egilok, EGIS PHARMACEUTICALS PLC, Budapešť, Maďarsko)

hypolipidemika

- atorvastatin (Atorvastatin-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Německo)
- ezetimib (Ezetrol, MSP Singapore Copany, LLC., Nizozemsko)

rozpouštědlo léku a placebo

- *aqua pro injectione* (Sterile Water For Injection „Fresenius“, Fresenius Kabi Italia S. r. l., Verona, Itálie)

analgesedace

- ketamin (NARKAMON SPOFA 1%; SPOFA a.s. Praha, Česká Republika)
- midazolam (MIDAZOLAM TORREX 5MG/ML; Torrex Chiesi Pharma GMBH, Vídeň, Rakousko)

3.3 Experimenty

Byly provedeny tři studie na potkanech samcích, kterým byly podávány vybrané léky. V každé skupině bylo vždy 8 zvířat.

1. experiment

Léky byly podávány samcům potkanů kmene Wistar 1x denně ve formě suspenze žaludeční sondou po dobu 8 týdnů. Suspenze byla připravena naředěním léku pomocí *aqua pro injectione* tak, aby byla vždy podávána v množství 0,2 ml/100 g tělesné hmotnosti (BW) potkana. Každý potkan byl před aplikací zvážen, abychom léčivo podali v přesné dávce.

Experimentální skupiny

1. kontrolní skupina dostávala *aqua pro inj.*
2. skupina ezetimib (1 mg/kg BW)
3. skupina atorvastatin (3 mg/kg BW)
4. skupina metoprolol (5 mg/kg BW)
5. skupina amlodipin (3 mg/kg BW)
6. skupina kombinaci atorvastatin (3 mg/kg BW) a amlodipin (3 mg/kg BW)

Po 8 týdenní aplikaci léků bylo potkanům provedeno v analgosedaci (0,5 mg/100 g BW midazolamu i. m. a 10 mg/100 g BW ketaminu i. m.) denzitometrické vyšetření pro stanovení hustoty kostního minerálu.

2. experiment

Na začátku pokusu byla 32 potkanům kmene Wistar provedena oboustranná orchidektomie (ORCH) v éterové narkóze. U potkanů SHAM byl proveden pouze operační řez na šourku, který byl následně zašit. Druhý den po operaci se začala podávat experimentálním potkanům SLD obohacená o léčiva (Albert Weber - SEMED, Praha) a kontrolním skupinám pouze SLD, všechny diety *ad libitum*. Experiment trval 12 týdnů. Podle spotřeby diety byla vypočítána dávka léku na kilogram tělesné hmotnosti potkana (BW).

Experimentální skupiny

7. kontrolní skupina sham-operovaných potkanů byla krmena standardní laboratorní dietou (SLD)
8. kontrolní skupina po provedené orchidektomii (SLD)
9. skupina po ORCH přijímající metoprolol (54 mg/kg BW; 25 g SLD + 24 mg MET)
10. skupina po ORCH přijímající amlodipin (3 mg/kg BW; 25 g SLD + 1 mg AML)
11. skupina po ORCH přijímající atorvastatin (12 mg/kg BW; 25 g SLD + 6 mg AT)

3. experiment

Třetí pokus byl koncipován stejně jako pokus druhý s výjimkou použití kmene potkanů. Ve třetím experimentu byli použiti spontánně hypertenzní potkani (SHR), kterým byla podávána příslušná antihypertenziva formou diet, které byly připraveny ve Viváriu UK-LF HK. Podle spotřeby diety byla vypočítána dávka léku na kilogram tělesné hmotnosti potkana (BW).

Experimentální skupiny

1. kontrolní skupina SHAM byla krmena standardní laboratorní dietou (SLD)
2. kontrolní skupina po provedené orchidektomii (SLD)
3. skupina po ORCH přijímající metoprolol (50 mg/kg BW; 25 g SLD + 24 mg MET)
4. skupina po ORCH přijímající amlodipin (2,5 mg/kg BW; 25 g SLD + 1 mg AML)

3.4 Materiál a metody

3.4.1 Stanovení kostních markerů

Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové narkóze ve viváriu UK-LF HK. Koncentrace kostních markerů byly stanoveny v séru a v kostním homogenátu.

Příprava vzorků:

Sérum

Získaná krev byla 2 hodiny po odběru centrifugována při 3 500 otáčkách/min po dobu 10 minut při 4 °C. Poté bylo sérum odsáto a rozpipetováno do příslušných mikrozkušavek eppendorf v potřebných aliquotech a zamraženo na -80 °C až do doby analýzy.

Kostní homogenát

Homogenáty byly připraveny z tibií, které byly vyjmuty *post mortem* a důkladně očištěny od přilehlých šlach a měkkých tkání. Proximální část kosti (0,1 g) byla homogenizována v 1,5 ml fosfátového pufru (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) ve zkumavkách s keramickou kuličkou (Lysing Matrix A, MP Biomedicals, LLC, USA) na přístroji MagNA Lyser (Roche Applied Science, Německo) ve třech cyklech při 6500 rpm po dobu 20 sekund. Mezi každým cyklem byly vzorky chlazeny 5 minut v chladícím kruhu (MagNA Lyser Cooling Block). Homogenát byl přepipetován do zkumavek eppendorf a zcentrifugován při 10 000 g a 4 °C po dobu 10 min. Získaný supernatant byl napipetován v požadovaném množství do zkumavek eppendorf a zamražen na -80°C.

V získaném krevním séru byly sledovány v prvním experimentu koncentrace markerů kostního obratu – CTX-I, OC, PINP a BALP pomocí metody ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay) s využitím kitů:

- CTX-I, RatLaps™ EIA ($\mu\text{g/l}$), Immunodiagnostic Systems Ltd., Velká Británie
- OC, Rat-MID™ Osteocalcin EIA ($\mu\text{g/l}$), Immunodiagnostic Systems Ltd., Velká Británie
- PINP, Rat/Mouse PINP EIA ($\mu\text{g/l}$), Immunodiagnostic Systems Ltd., Velká Británie
- BALP, Rat bone alkaline phosphatase (U/l), Usclife Sciences & Technology Co., Ltd, Čína

U druhého experimentu byly sledovány koncentrace sérových markerů kostního obratu PINP, IGF-1 a OPG. V kostním homogenátu z proximální části tibie bylo sledováno množství kostních markerů BALP, BMP-2 a CTX-I s využitím ELISA kitů firmy Usclife Sciences & Technology Co., Ltd, Čína.

Ve třetím experimentu byly sledovány koncentrace sérových markerů kostního obratu IGF-1 a OPG. V kostním homogenátu z proximální části tibie byly sledovány hladiny kostních markerů BALP, BMP-2, PINP a CTX-I s využitím kitů firmy Usclife Sciences & Technology Co., Ltd, Čína:

- CTX-I, Rat Gross linked C-telopeptide of type I collagen ($\mu\text{g/l}$)
- PINP, Rat procollagen I N-terminal propeptide ($\mu\text{g/l}$)
- BALP, Rat bone alkaline phosphatase (U/l)
- IGF-1, Rat insulin like growth factor 1 ($\mu\text{g/l}$)
- BMP-2, Rat bone morphogenetic protein 2 ($\mu\text{g/l}$)
- OPG, Rat osteoprotegerin ($\mu\text{g/l}$)

3.4.2 Stanovení koncentrace lipidů v séru a vápníku v séru a v tibii

Biochemické vyšetření spektra lipidů v séru – celkového cholesterolu, HDL- a LDL-cholesterolu, triacylglycerolů a aterogenního indexu bylo provedeno na automatickém analyzátoru Modular PPE Roche (Mannheim, Německo) dle pokynů výrobce.

V krevním séru byla stanovena koncentrace celkového vápníku na přístroji Modular PPE Roche (Mannheim, Německo) setem (Roche) s využitím o-cresolphthalein complexonu dle pokynů výrobce.

V tibii potkana bylo ve druhém pokusu stanoveno množství vápníku pomocí plamenové fotometrie na plamenovém fotometru EFOX 5053 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Německo) a ve třetím experimentu metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie na analyzátoru AAS DUO 280 Z + 240 FS (Varian Australia Pty Ltd, Austrálie).

Analýzy byly provedeny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK).

3.4.3 Měření kostní minerální hustoty

Na konci pokusu byla potkanům změřena celotělová kostní minerální hustota (BMD; bone mineral density, g/cm^2) pomocí dvouenergievé rentgenové absorpciometrie (DXA; Dual Energy X-ray Absorptiometry) na přístroji Hologic Delphi A v Osteocentru FN HK. V případě prvního experimentu byli potkani vyšetřeni v analgosedaci (5 mg/kg midazolamu a 100 mg/kg ketaminu; i.m.) den před usmrcením. U druhého a třetího experimentu byli potkani vyšetřeni ten samý den po usmrcení. Kostní minerální hustota ve zvolených oblastech byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA, Hologic, MA, USA). V prvním experimentu byla vyhodnocena BMD celého těla, v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru. Ve druhém a třetím pokusu byla hodnocena BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a u obou femurů (obrázek 9), a také byla stanovena hmotnost svalové a tukové tkáně a procentuální zastoupení tukové tkáně.

Usmrcení potkani byli po změření převezeni zpět na Vivárium UK-LF HK, kde jim byly vyňaty oba femury, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a zmrazeny na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ až do doby analýzy. Před DXA vyšetřením byly femury rozmrazeny při pokojové teplotě a udržovány ve zvlhčeném stavu

Obrázek 6: Očištěný femur a jeho scan s vyznačenými hodnocenými oblastmi kostní minerální hustoty
R1-proximální část; R2-distální část
R3-oblast diafýzy

fyziologickým roztokem. Pro změření BMD byly pokládány na stůl vždy ve stejné poloze. Byla hodnocena BMD celého femuru, dále proximální části, diafýzy a distální části femuru (obrázek 10).

3.4.4 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Femury byly využity k testování mechanické odolnosti kostní tkáně na speciálním elektromechanickém přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká Republika, obr. 12 a). Femury, které byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly před testováním rozmrazeny při pokojové teplotě a během celé procedury udržovány v gáze zvlhčené fyziologickým roztokem. Před testováním byla změřena délka femuru (obr. 11 a) a byl označen střed v oblasti diafýzy voděodolným fixem. V označené oblasti, ve které byl femur testován, byl změřen průměr kosti (obr. 11 b). Zjišťovaným parametrem byla mechanická odolnost kosti proti ohybu. Femury byly testovány ve středu diafýzy pomocí tříbodového ohýbání kosti (three-point bending). Kost byla položena na dva podpůrné body, vzdálené od sebe 18 mm (obr. 12 b). Femur byl testován v anteroposteriorním směru. Kost byla nejprve malou silou do 10 N fixována ve stabilní poloze a poté byl spuštěn elektromotorek snižující nerezový váleček s konstantní rychlostí 6 mm/min (Turner a Burr, 1993). Po zlomení byly fotograficky zdokumentovány linie lomu femurů a změřena tloušťka kompakty na distální části femuru ve směru lámání (obr. 11 c) pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie).

Obrázek 7: Mechanické testování femurů I

- a) měření délky femuru
- b) měření průměru femuru
- c) měření tloušťky kompaktní části femuru po three-point bending testu
- d) zabalené proximální části femuru po zlomení, z důvodu zabránění vysychání před testováním tlakové odolnosti krčku femuru
- e) dvousložková pryskyřice Spofacryl
- f) upevnění proximální části zlomeného femuru do speciální nádoby ve svislé poloze před testováním tlakové odolnosti krčku femuru

Dále byla testována tlaková odolnost krčku femuru (obr. 12 c), neboť převážná část osteoporotických zlomenin vzniká právě v této oblasti. K testování tlakové

odolnosti krčku femuru byla využita proximální část kosti. Hlavice a krček femuru byly zabaleny do zvlhčené gázy, aby bylo zabráněno jejich vysychání během následující procedury (obr. 11 d). Diafýza kosti byla zalita samopolymérující adhezivní pryskyřicí na bázi metakrylátu (Spofacryl-SpofaDental a.s.; Jičín, Česká Republika, obr. 11 e) do speciální nádoby a tím byla kost zafixována ve svislé poloze (obr. 11 f). Opět byla použita počáteční síla do 10 N k zajištění stabilního místa tlaku a konstantní rychlost nerezové tyčky se zakulaceným koncem 6 mm/min. Linie lomu krčku femurů byly fotograficky zdokumentovány (obr. 12 d). Maximální vynaložená síla (Newton; N) ke zlomení kostí - diafýzy a krčku femuru - byla zaznamenána měřicí jednotkou (Digitalanzeiger 9180, Burster praezisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo).

Obrázek 8: Mechanické testování femurů II

- a) elektromechanický přístroj k testování pevnosti kostní tkáně
- b) testování femuru pomocí three-point bending testu v anteroposteriorním směru
- c) testování tlakové odolnosti krčku femuru
- d) zlomený krček femuru po testování

3.4.5 Stanovení množství kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) metodou Western blot

Pro přípravu homogenátu byla využita proximální část tibie (100 mg). Do speciálních zkumavek (Lysing Matrix A, MP Biomedicals, LLC, USA) s keramickou kuličkou, které byly po celou dobu přípravy chlazeny na ledové tříšti, bylo napipetováno 0,5 ml RIPA pufru (Radio-Immunoprecipitation Assay; RIPA buffer, Sigma-Aldrich, USA) a 5 μ l každého proteázového inhibitoru – aprotinin (2 μ g/ml), leupeptin (0,5 μ g/ml) a benzamidin (50 μ g/ml). Zkumavky byly vloženy do homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Applied Science, Německo). Homogenizace probíhala ve 3 cyklech, každý při 6500 rpm a po dobu 20 s. Mezi jednotlivými cykly byly vzorky chlazeny 5 minut v chladičím kruhu (MagNA Lyser Cooling Block). Homogenát byl přepipetován do zkumavek eppendorf a zcentrifugován (10000 g, 4 °C, 10 min). Získaný supernatant byl napipetován v požadovaném objemu do zkumavek eppendorf a zamražen na -80 °C.

Koncentrace proteinů byla změřena na spektrofotometru UV-VIS Spectronic Helios Gamma (Thermo Scientific, USA). Vzorky byly naředěny fyziologickým roztokem tak, aby v každém bylo 25 μg proteinů. Z každé skupiny zvířat byl připraven směsný vzorek tzv. pool z 8 potkanů (200 μg). Vzorky supernatantu z kostních homogenátů byly v poměru 2:1 (vzorek:pufř) smíchány se vzorkovým pufřem a 5 minut zahřívány na 95 °C.

Vzorkový pufř:

K 3x koncentrovanému vzorkovému pufřu přidat:

- β -MerkaptoEthanol – 85:15 (tj. na 100 μl pufřu 85 μl 3x konc. pufřu a 15 μl β -MerkaptoEthanolu)
- Bromfenolová modř – k 100 μl pufřu s β -MerkaptoEthanolem přidat 10 μl bromfenolové modři

V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 12% separační a 4% zaostřovací polyakrylamidový gel. Do první jamky zaostřovacího gelu byl nanesen marker molekulové hmotnosti (4 μl ; Precision plus proteinTM standards, Bio-Rad) a do dalších jamek byly naneseny vzorky se stejným množstvím proteinů (200 μg). Separace proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) probíhala v migračním pufřu při 200 V, 240 mA po dobu cca 70 min.

Rozdělovací gel 12%

- 5 ml dH₂O (deionizovaná voda)
- 3,75 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8
- 6 ml akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid: 30 % akrylamid, 0,8 % bisakrylamid
- 75 μl SDS (dodecylsulfát sodný)
- 37,5 μl APS (peroxodisíran amonný)
- 5 μl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)

Zaostřovací gel 4%

- 3,05 ml dH₂O
- 1,25 ml 1,5M Tris-HCl pH 6,8
- 0,65 ml akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid: 30 % akrylamid, 0,8 % bisakrylamid
- 75 µl SDS
- 37,5 µl APS
- 3,75 µl TEMED

Migrační pufr

- 30 g Tris-base
- 144 g glycin
- 5 g SDS
- doplnit dH₂O do 5 l

Po rozdělení proteinů nastal jejich přenos („western blotting“) na polyvinylidendifluoridovou membránu v přenosovém pufru při 100 V, 250 mA po dobu cca 120 min.

Přenosový pufr

- 15,15 g Tris-base
- 72 g glycin
- 1000 ml methanol
- doplnit dH₂O do 5 l

Po přenosu proteinů byla membrána promyta TBS/Tween (3x 5 min.) a následně zbylá vazebná kapacita membrány blokována laktoglobuliny v TBS/Tween s 5% mlékem (Non-fat dry milk, Bio-Rad) nejméně 60 min. Poté byla membrána opět promyta v TBS/Tween (3x 10 min.) a inkubována s primární protilátkou při 4 °C přes noc. Po promytí v TBS/Tween (3x10 min.) byla membrána inkubována se sekundární

protilátkou v TBS/Tween s 5 % mléka při pokojové teplotě 60 min. Po inkubaci byla membrána promyta (3x 10 min. v TBS/Tween a 3x 10 min. v TBS). Detekce imunokomplexů byla provedena chemiluminiscenčně pomocí ECL kitu (ECL, Chemiluminescence blotting substrate, Roche, Německo) s následnou expozicí filmu (Foma, Hradec Králové). Získaný obraz byl naskenován do počítače (ScanMaker i900, UMAX, Praha, Česká Republika). Správné nanesení vzorků na gel bylo ověřeno imunodetekcí β -aktinu. Porovnání skupin, kterým bylo podáváno vybrané léčivo s kontrolní skupinou, bylo provedeno pouze kvalitativně.

10x koncentrovaný TBS, pH 7,6

- 48,4 g Tris-base
- 160 g NaCl (FLUCA)
- 76 ml 1 M HCl (83 ml do 1 l)
- doplnit dH₂O do 2 l

TBS

- 200 ml 10x koncentrovaný TBS
- doplnit dH₂O do 2 l

TBS – 0,05% Tween

- 1 ml Tween-20
- 200 ml 10x TBS
- doplnit dH₂O do 2 l

Primární protilátky:

- Monoclonal Anti- β -actin antibody produced in mouse clone AC-74, ascites fluid (ředění 1:250; A5316, Sigma-Aldrich, USA)

- Anti-BMP2 antibody, Rabbit polyclonal to BMP2 (ředění 1:20 000; ab14933, Abcam, Velká Británie)

Sekundární protilátky:

- Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (ředění 1:1000; P 0447, Dako, Dánsko)
- Polyclonal Swine Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated (ředění 1:25 000; E 0453, Dako, Dánsko)

3.4.6 Statistická analýza a zpracování dat

Statistické analýzy byly provedeny na Oddělení výpočetní techniky. Byl použit program NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). V případě porovnání dvou skupin byl použit dvou-výběrový *t*-test, v případě zamítnutí normality neparametrické testy Mann-Whitney test nebo Kolmogorov-Smirnov test. Pro porovnání sledovaných parametrů třech skupin mezi sebou byla zvolena analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem, v případě zamítnutí normality Kruskal-Wallisova neparametrická analýza rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Dunnovým testem (s Bonferroni modifikací). Proměnné jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD), v případě zamítnuté normality jako medián a mezikvartilové rozpětí (25.-75. percentil). Ke grafickému znázornění byly použity krabičkové grafy (Box plot), kde byly označeny skupiny, které se statisticky významně lišily od příslušné kontroly. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha=0,05$.

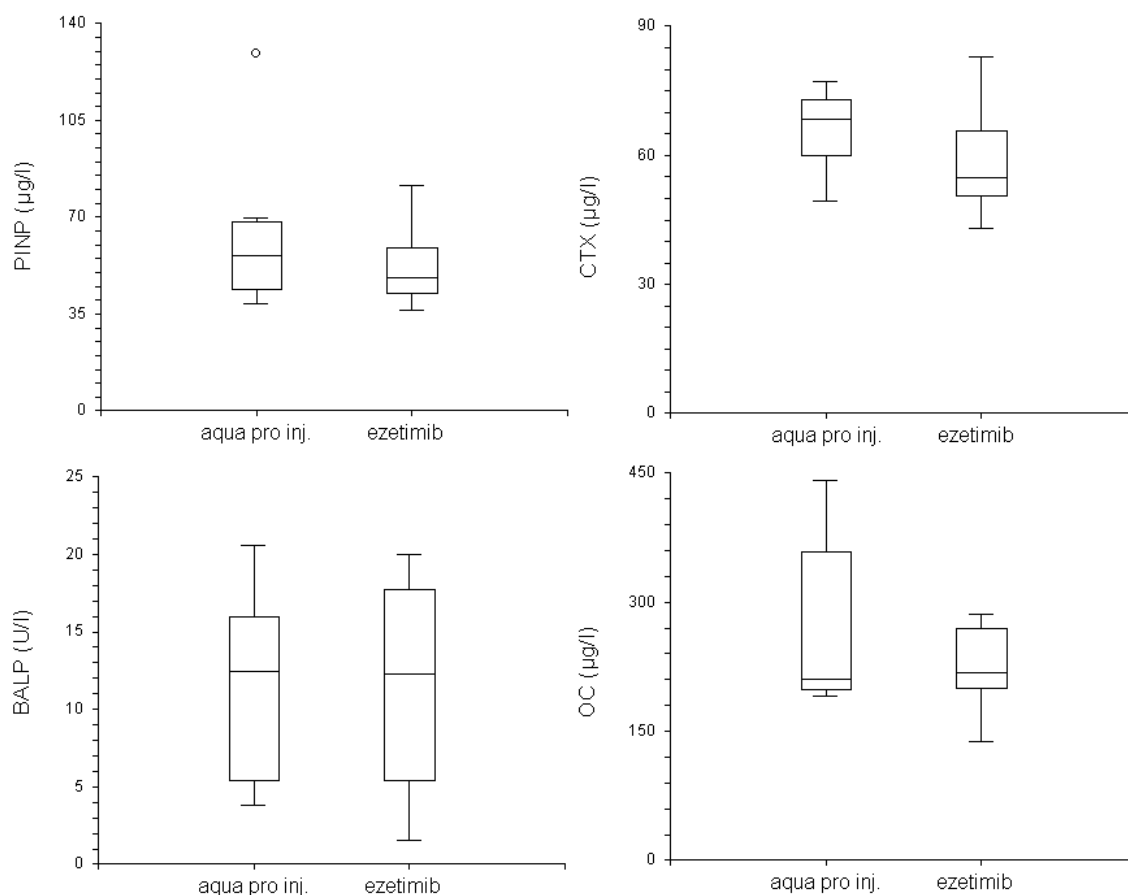
4 Výsledky

4.1 Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů

4.1.1 Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

Po 8 týdnech podávání ezetimibu zdravým samcům potkanů kmene Wistar nedošlo k statisticky významným změnám v sérových koncentracích kostních markerů (graf 1), kostní minerální hustoty v hodnocených oblastech (tabulka 2), mechanických vlastnostech femurů (tabulka 3), a ani v množství kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální tibií (obrázek 13) v porovnání s kontrolní skupinou.

Graf 1: Vliv ezetimibu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; ezetimib, potkani, kterým byl podáván ezetimib v dávce 1 mg/kg/den.

Tabulka 2: Vliv ezetimibu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

Kostní minerální hustota (g/cm²)	aqua pro inj.	ezetimib
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,223±0,014	0,212±0,005
BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	0,222±0,012	0,228±0,004
BMD femuru (g/cm ²)	0,189±0,021	0,173±0,008
Celý LF (g/cm ²)	0,109±0,042	0,088±0,009
Proximální část LF (g/cm ²)	0,121±0,039	0,099±0,013
Diafýza LF (g/cm ²)	0,102±0,055	0,073±0,012
Distální část LF (g/cm ²)	0,092±0,050	0,058±0,007

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; ezetimib, potkani, kterým byl podáván ezetimib v dávce 1 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur

Tabulka 3: Vliv ezetimibu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.

Mechanické vlastnosti kostní tkáně	aqua pro inj.	ezetimib
<i>Levý femur</i>		
Délka femuru (mm)	37 (36-37)	36 (36-37)
Průměr femuru (mm)	3,55 (3,51-3,60)	3,53 (3,47-3,59)
Three-point bending (N)	174 (168-191)	176 (167-189)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (119-161)	152 (127-171)
<i>Pravý femur</i>		
Délka femuru (mm)	37 (36-38)	37 (37-38)
Průměr femuru (mm)	3,38 (3,31-3,44)	3,42 (3,23-3,51)
Three-point bending (N)	192 (173-205)	180 (158-202)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (96-154)	145 (132-151)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; ezetimib, potkani, kterým byl podáván ezetimib v dávce 1 mg/kg/den.

Obrázek 9: Vliv ezetimibu na hladinu BMP- 2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.

kontrola, kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; ezetimib, potkani, kterým byl podáván ezetimib v dávce 1 mg/kg/den.

BMP-2, kostní morfo-genetický protein 2

4.2 Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů

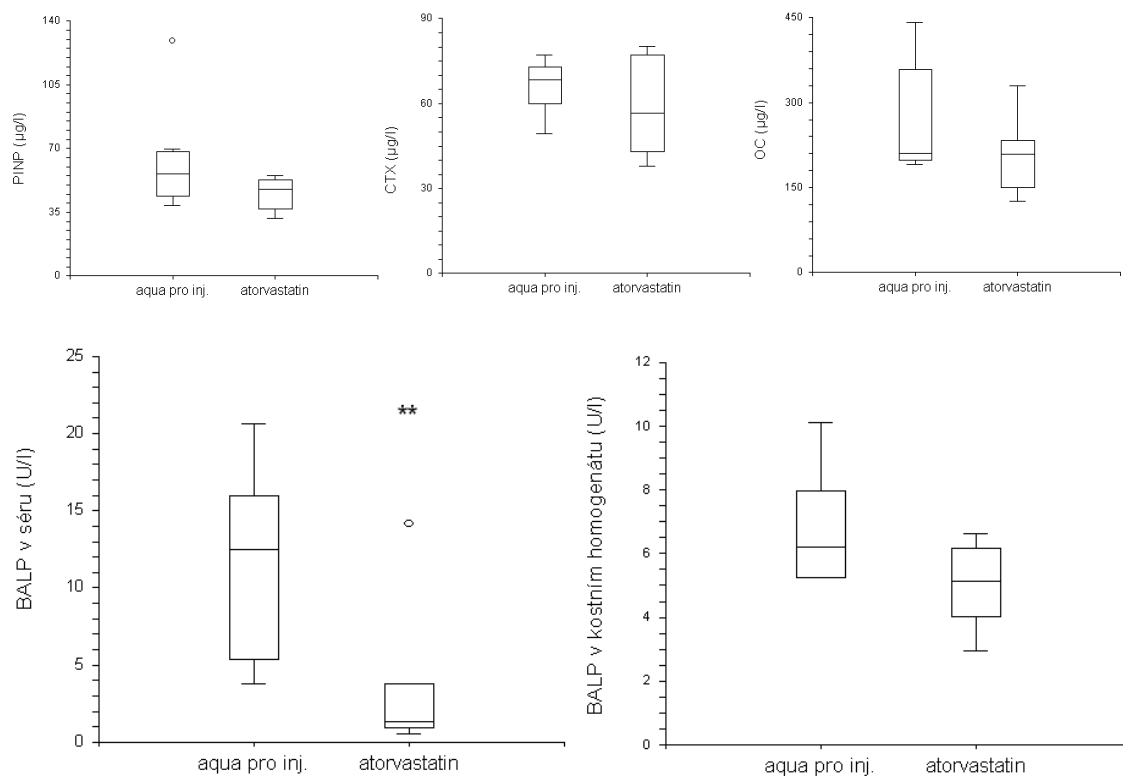
4.2.1 Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

U potkanů, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 3 mg/kg BW byl prokázán po 8 týdnech signifikantní pokles parametru BALP na 30 % ($p=0,005$) v porovnání s kontrolní skupinou. Kostní izoforma alkalické fosfatázy se snížila též i v kostním homogenátu z proximální části tibie, ale statisticky nevýznamně. U ostatních markerů kostního obratu nebyla prokázána signifikantní změna v koncentracích mezi skupinami (graf 2).

Naměřené hodnoty kostní minerální hustoty ve všech hodnocených oblastech neprokázali signifikantní rozdíl mezi skupinami (tabulka 4).

Mechanické hodnocení femurů neprokázalo statisticky významné změny mezi skupinami. Pouze průměr levého femuru byl signifikantně menší v porovnání s kontrolou. V ostatních hodnocených parametrech se femury signifikantně nelišily (tabulka 5).

Množství BMP-2 v proximální části tibie se po 8 týdnech podávání atorvastatinu signifikantně vzrostlo v porovnání s kontrolou (obrázek 14).

Graf 2: Vliv atorvastatinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; atorvastatin, potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (** p<0,01)

BALP v séru (p=0,005)

Tabulka 4: Vliv atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

Kostní minerální hustota (g/cm ²)	aqua pro inj.	atorvastatin
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,223±0,014	0,217±0,012
BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	0,222±0,012	0,234±0,010
BMD femuru (g/cm ²)	0,189±0,021	0,175±0,013
Celý LF (g/cm ²)	0,109±0,042	0,118±0,038
Proximální část LF (g/cm ²)	0,121±0,039	0,139±0,042
Diafýza LF (g/cm ²)	0,102±0,055	0,110±0,049
Distální část LF (g/cm ²)	0,092±0,050	0,080±0,050

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; atorvastatin, potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 3 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur.

Tabulka 5: Vliv atorvastatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.

Mechanické vlastnosti kostní tkáně	aqua pro inj.	atorvastatin
Levý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-37)	36 (36-37)
Průměr femuru (mm)	3,55 (3,51-3,60)	3,50 (3,45-3,52)*
Three-point bending (N)	174 (168-191)	173 (160-187)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (119-161)	144 (122-177)
Pravý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-38)	37 (37-38)
Průměr femuru (mm)	3,38 (3,31-3,44)	3,46 (3,40-3,47)
Three-point bending (N)	192 (173-205)	176 (163-203)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (96-154)	139 (131-142)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; atorvastatin, potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (* p<0,05; p=0,02)

Obrázek 10: Vliv atorvastatinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.

kontrola, kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; atorvastatin, potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 3 mg/kg/den.

BMP-2, kostní morfogenetický protein 2

4.2.2 Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar

Během experimentu (30. den po zahájení experimentu) došlo k úhynu jednoho potkana z neznámých příčin ve skupině atorvastatin. Konečná statistická analýza byla provedena se získanými daty zbylých potkanů.

Před zahájením pokusu byla 16 potkanům (skupina kontrola a atorvastatin) provedena oboustranná orchidektomie. Jejím vlivem došlo k poklesu hodnot tělesných hmotností na začátku a na konci experimentu v porovnání se skupinou sham. Na začátku pokusu signifikantně poklesla hmotnost potkanů ve skupině atorvastatin na 93 % (p<0,01) a nesignifikantně kontrola v porovnání s sham. Po 12 týdnech byl prokázán signifikantní pokles u obou skupin – kontrola na 87 % (p<0,01), atorvastatin na 90 % (p<0,05) vs. sham (tabulka 6).

Orchidektomie u kontrolní skupiny způsobila po 12 týdnech statisticky významný pokles množství svalové tkáně na 81 % ($p < 0,001$) a procentuální nárůst tukové tkáně na 143 % ($p < 0,01$) v porovnání s sham-operovanými potkany (tabulka 7).

Stanovením lipidového spektra v séru byl ověřen hypolipidemický účinek atorvastatinu. Po 12 týdnech podávání atorvastatinu došlo k signifikantnímu poklesu triacylglycerolů a atoregenního indexu, dále nesignifikantnímu poklesu celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a nárůstu HLD-cholesterolu v porovnání s kontrolou. Samotná orchidektomie ukázala negativní vliv na lipidové spektrum signifikantním zvýšením aterogenního indexu v porovnání se skupinou sham (tabulka 8).

Ani provedená orchidektomie, a ani podávaný atorvastatin signifikantně neovlivnily množství vápníku v séru a v tibií mezi skupinami (graf 3).

Vlivem orchidektomie došlo k statisticky významnému nárůstu koncentrací BALP, CTX-I a BMP-2 v porovnání s sham. Po podávání atorvastatinu byl prokázán signifikantní pokles CTX-I, BMP-2 a OPG v porovnání s kontrolou. Atorvastatin také zvýšil sérovou hladinu IGF-1 vs. kontrola. Tento růstový faktor byl vlivem orchidektomie signifikantně snížen u skupiny kontrola vs. sham (graf 4).

Byl potvrzen negativní vliv orchidektomie na kostní minerální hustotu, kdy došlo k statisticky významnému poklesu celotělové BMD, v oblasti obou femurů a v oblasti bederních obratlů (graf 5). Dále na samotných vypreparovaných femurech byl prokázán signifikantní pokles BMD v diafýze obou femurů a celého pravého femuru vs. sham (tabulka 9). Po podání atorvastatinu došlo k signifikantnímu nárůstu celotělové BMD, v hodnocených oblastech skeletu byl též patrný nárůst BMD, ale statisticky nevýznamný v porovnání s kontrolní skupinou (graf 5).

Vlivem orchidektomie došlo ke zpomalení růstu kostí, což potvrzují naměřené hodnoty délky a průměru femurů, které byly signifikantně menší vs. sham. Dále byla zjištěna menší tloušťka kortikalis anteriorní části femuru v oblasti zlomené diafýzy. Statistická významnost byla prokázána pouze u levého femuru, u pravého femuru je též patrný nesignifikantní pokles kortikalis vs. sham (graf 6). Z toho vyplývá další zjištění poklesu tlakové síly u orchidektomované kontroly ve středu diafýzy femuru vs. sham (graf 7). Po 12 týdnech podávání atorvastatinu způsobil zlepšení růstu a vývoje kostní hmoty. Délka, průměr a tloušťka kortikální části kosti levého femuru byla

signifikantně větší v porovnání s kontrolou. U pravého femuru byla naměřena pouze délka se statistickou významností vs. kontrola, ostatní parametry vykazují nesignifikantní zvětšení vs. kontrola (graf 6). Atorvastatin zvýšil pevnost kostní tkáně ve středu diafýzy vs. kontrola, opět se signifikancí pouze u levého femuru. Pravý femur vykazoval nesignifikantní zvýšení maximální tlakové síly nutné ke zlomení diafýzy vs. kontrola. Hodnoty maximální tlakové síly ke zlomení krčku femuru nevykazují signifikantní rozdíly mezi skupinami (graf 7).

Tabulka 6: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.

	sham	kontrola	atorvastatin
Hmotnost na začátku pokusu (g)	229±12	220±9	212±8^b
Hmotnost na konci pokusu (g)	569±58	496±27^b	512±35^c

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině sham (^b p<0,01, ^c p<0,05).

Tabulka 7: Vliv orchidektomie a atorvastatinu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.

	sham	kontrola	atorvastatin
Svalová tkáň (g)	416 (374-428)^a	335 (317-361)	344 (335-366)
Tuková tkáň (g)	68 (55-84)	86 (65-99)	82 (71-92)
Tuková tkáň (%)	14 (13-17)^b	20 (17-23)	20 (17-20)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01).

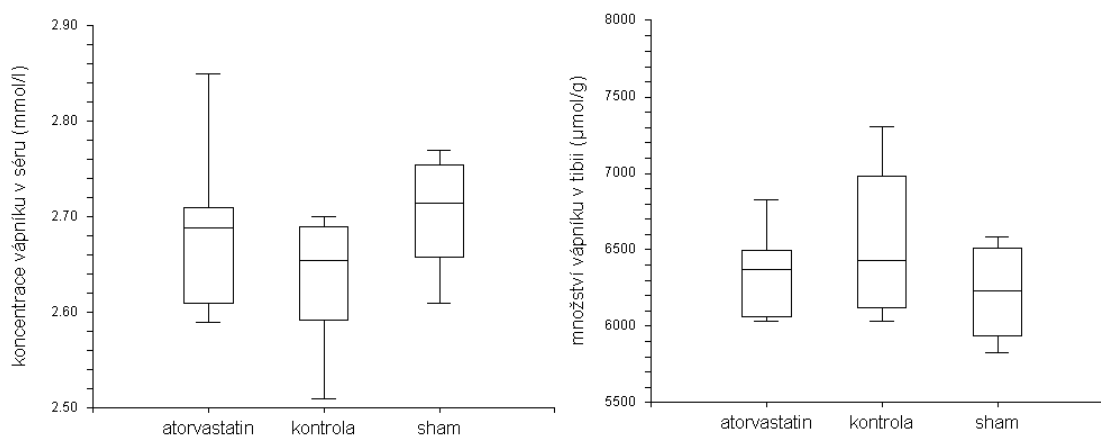
Tabulka 8: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na lipidové spektrum v séru u potkanů kmene Wistar.

	sham	kontrola	atorvastatin
Celkový cholesterol (mmol/l)	1,80 ± 0,21	2,20 ± 0,51	1,90 ± 0,34
LDL-cholesterol (mmol/l)	0,25 ± 0,06	0,34 ± 0,12	0,26 ± 0,07
HLD-cholesterol (mmol/l)	1,30 ± 0,18	1,37 ± 0,26	1,41 ± 0,23
Triacylglyceroly (mmol/l)	1,63 ± 0,39	1,63 ± 0,42	0,88 ± 0,43^b
Atorogenní index	0,38 ± 0,13^b	0,60 ± 0,19	0,36 ± 0,01^b

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

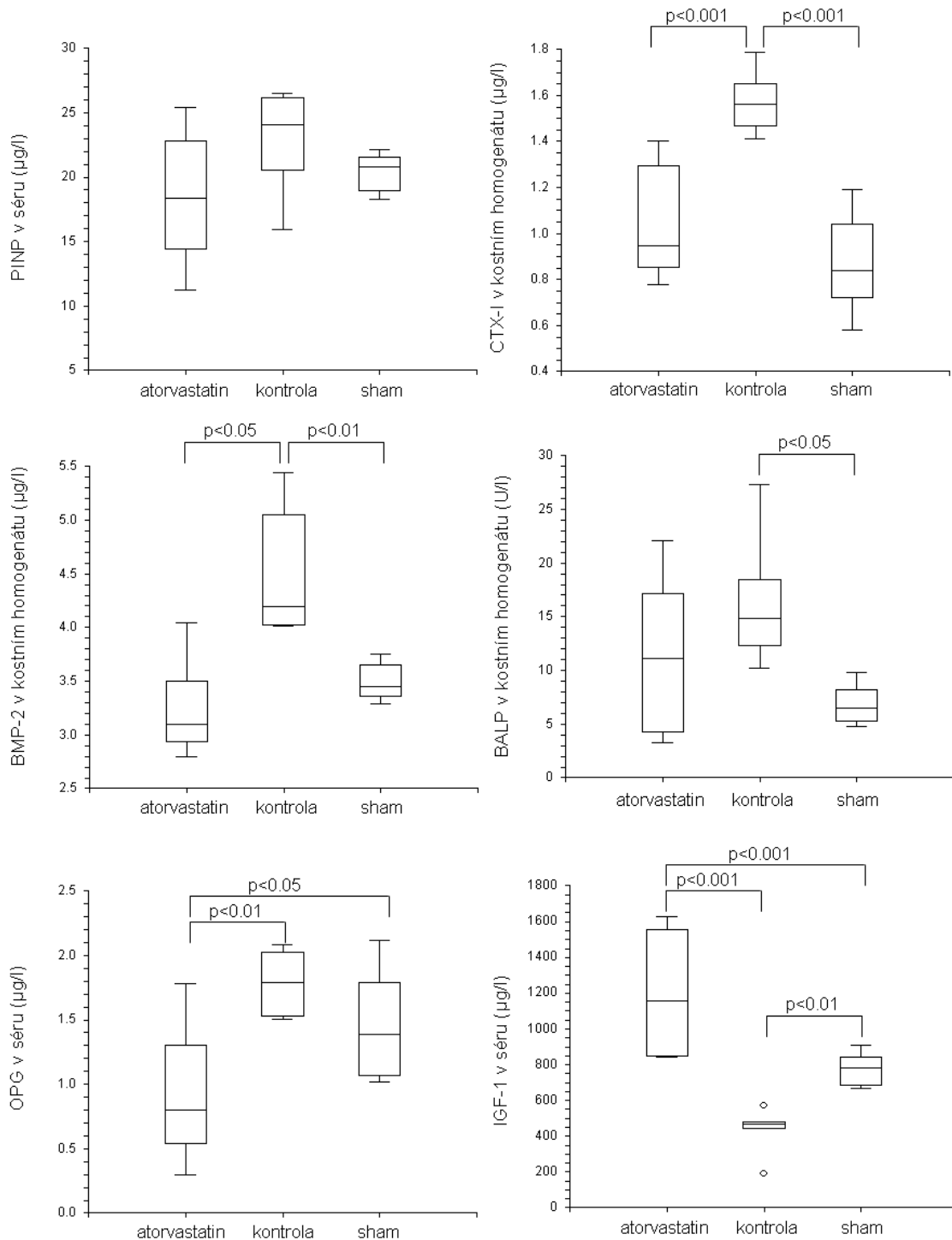
sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01).

Graf 3: Vliv orchidektomie a atorvastatinu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

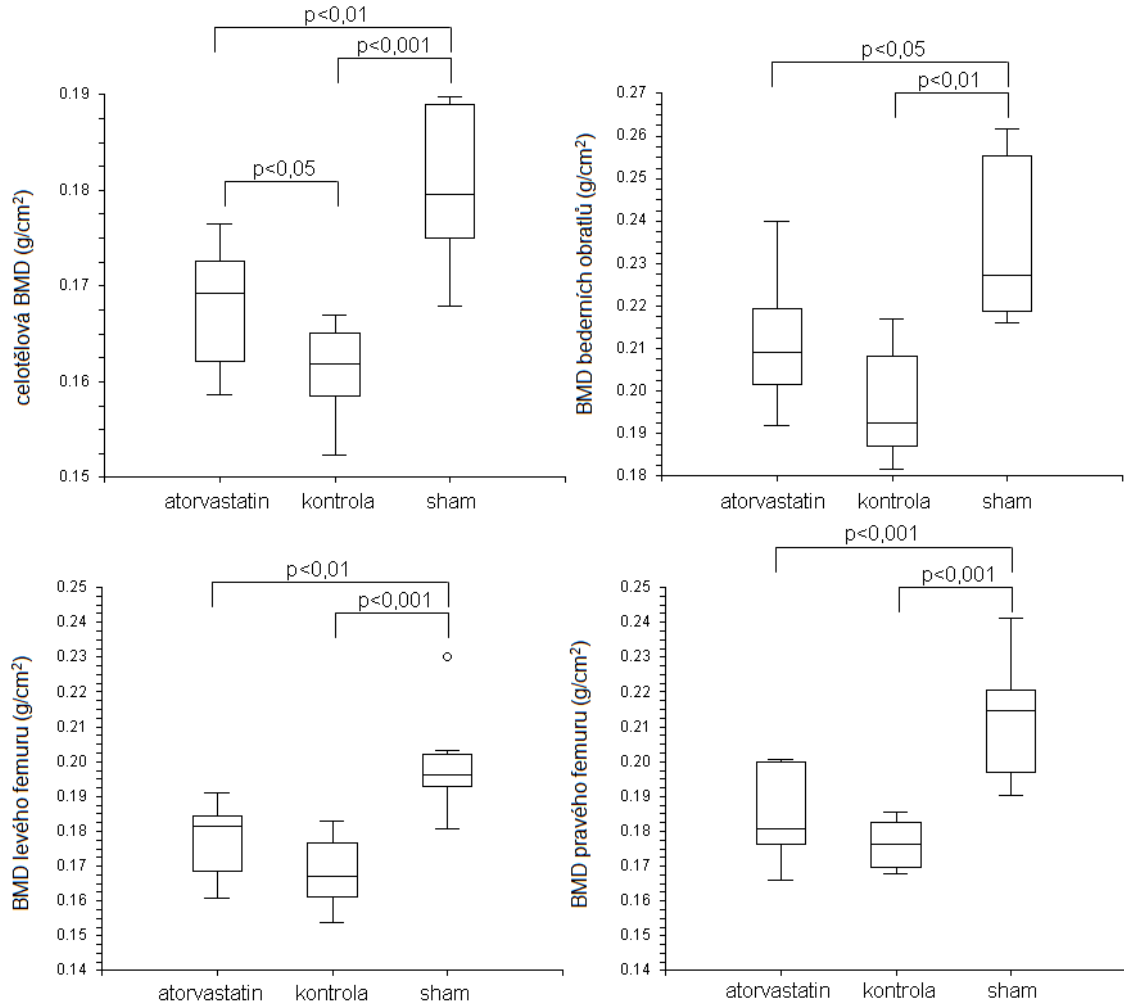
sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

Graf 4: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola ($n=8$), atorvastatin ($n=7$). sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 5: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Tabulka 9: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.

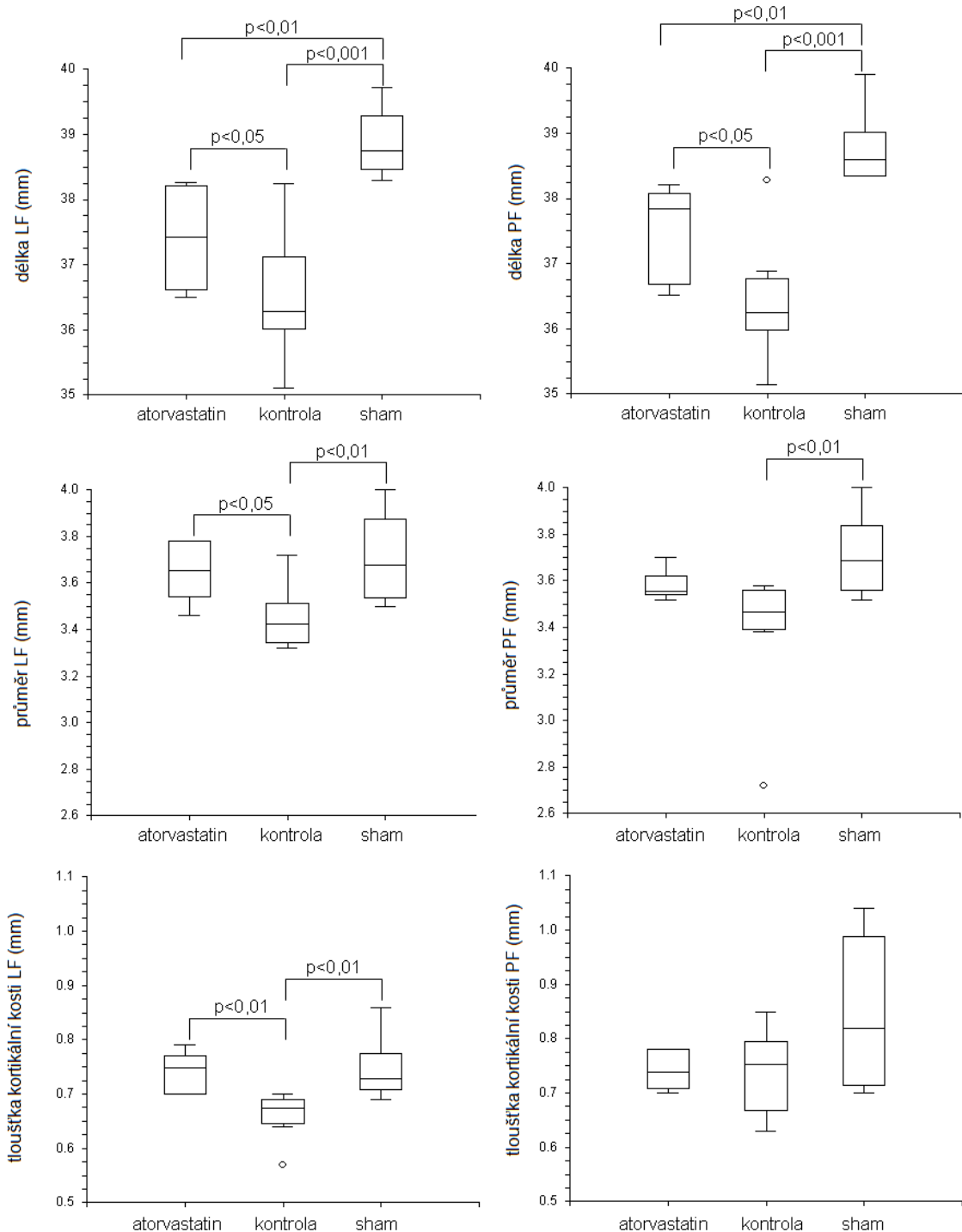
	sham	kontrola	atorvastatin
Celý LF (g/cm ²)	0,090 (0,086-0,112)	0,089 (0,073-0,108)	0,087 (0,079-0,088)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,114 (0,103-0,143)	0,122 (0,098-0,140)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,075 (0,066-0,095)^c	0,063 (0,045-0,076)	0,054 (0,051-0,066)
Celý PF (g/cm ²)	0,093 (0,085-0,110)^b	0,078 (0,067-0,086)	0,071 (0,067-0,075)
Proximální část PF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,090 (0,088-0,108)	0,084 (0,073-0,110)
Diafýza PF (g/cm ²)	0,078 (0,076-0,087)^b	0,057 (0,045-0,076)	0,053 (0,047-0,066)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01, ^c p<0,05).

Graf 6: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.

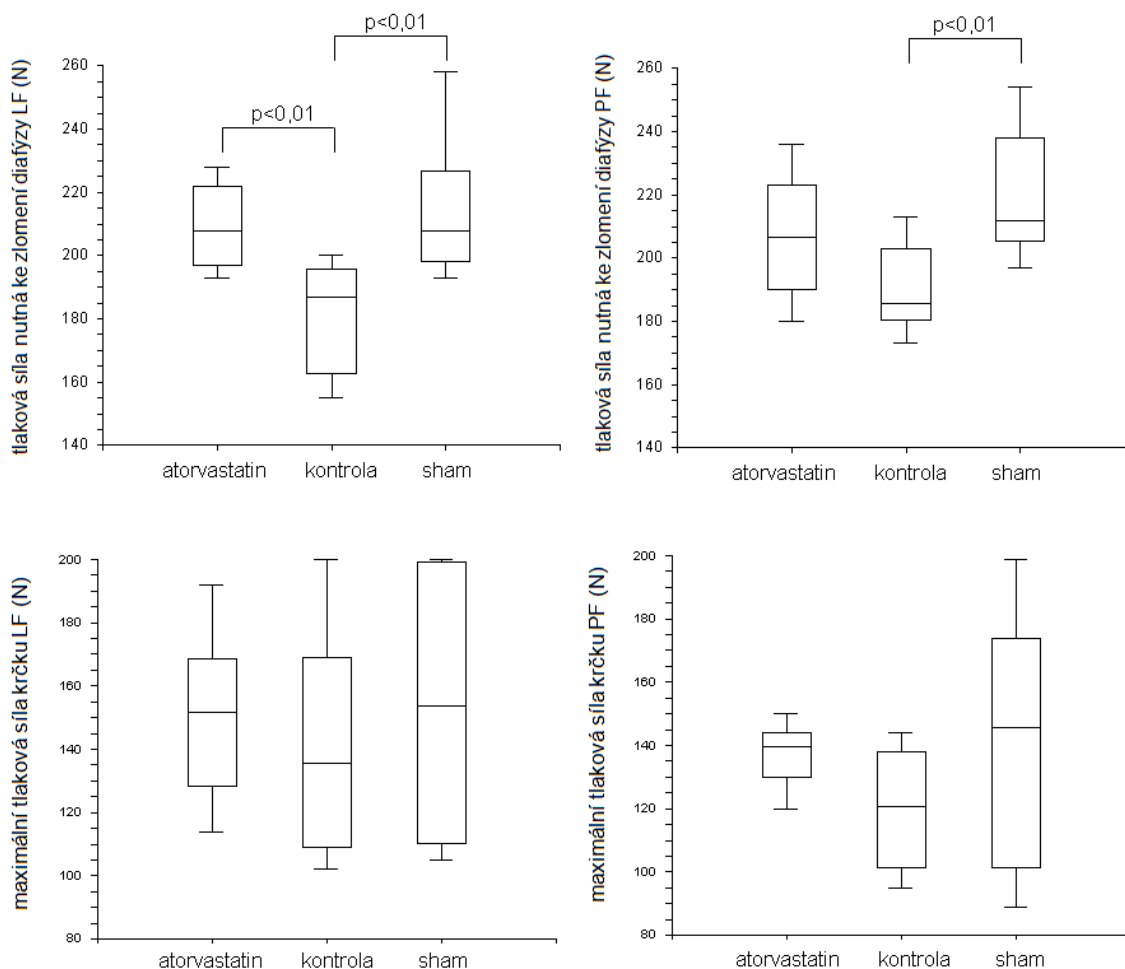
Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 7: Vliv orchidektomie a atorvastatinu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), sham a kontrola (n=8), atorvastatin (n=7).

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; atorvastatin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván atorvastatin v dávce 12 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

4.3 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů

4.3.1 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

Amlodipin v dávce 3 mg/kg BW po 8 týdnech podávání významně ovlivnil koncentraci markerů kostního obrátu. Po jeho podávání byl prokázán pokles v séru CTX-I na 75 % (p=0,003), PINP na 73 % (p=0,06), OC (p=42) na 83 %, BALP na 12 %

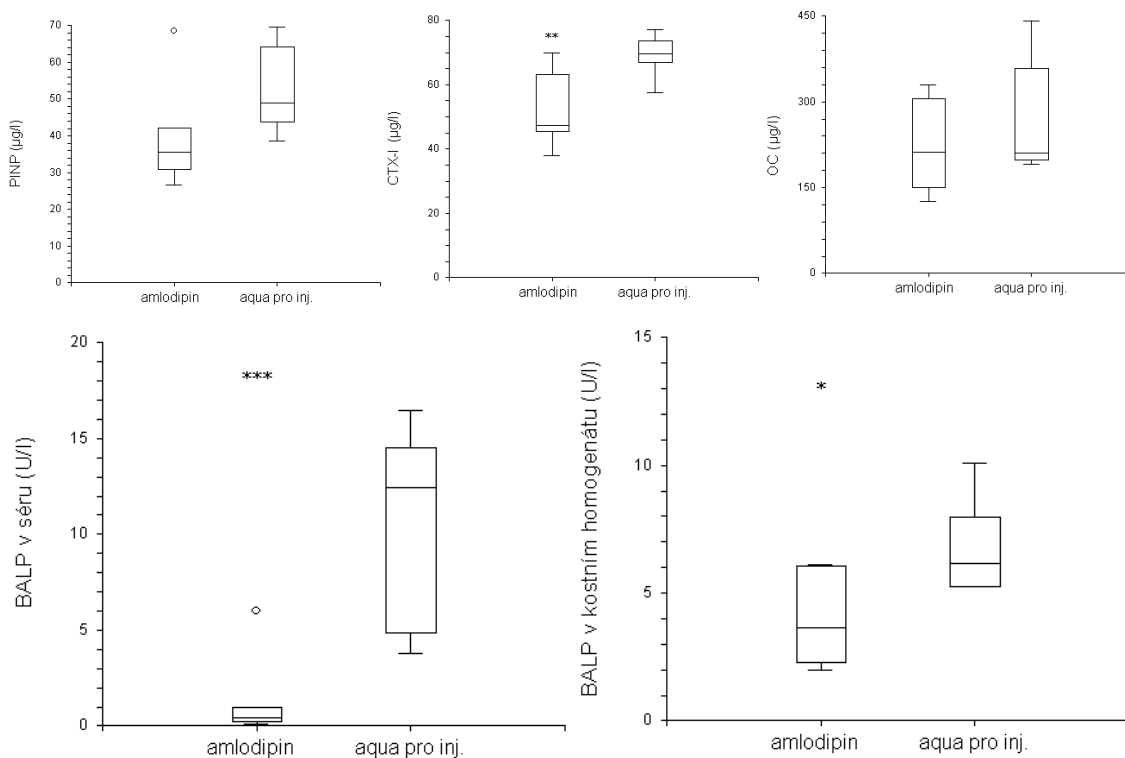
($p=0,0009$) a v kostním homogenátu BALP na 59 % ($p=0,026$) v porovnání s kontrolou (graf 8).

Po 8 týdnech podávání antihypertenziva nebyla prokázána změna BMD v žádné z hodnocených oblastí vs. kontrola (tabulka 10).

Amlodipin způsobil signifikantní zesílení průměru ve středu diafýzy pouze u pravého femuru vs. kontrola. Parametry mechanického testování femuru nevykazovaly statisticky významný rozdíl mezi skupinami (tabulka 11).

Po 8 týdnech způsobil amlodipin zvýšení množství BMP-2 v proximální části tibie v porovnání s kontrolní skupinou (obrázek 15).

Graf 8: Vliv amlodipinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), $n=8$.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin, potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

PINP ($p=0,06$); CTX-I ($p=0,003$); OC ($p=0,42$), BALP v séru ($p=0,0009$), BALP v kostním homogenátu ($p=0,026$)

Tabulka 10: Vliv amlodipinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

	aqua pro inj.	amlodipin
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,217 (0,213-0,224)	0,218 (0,214-0,220)
BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	0,218 (0,213-0,232)	0,231 (0,225-0,236)
BMD femuru (g/cm ²)	0,183 (0,171-0,210)	0,193 (0,180-0,209)
Celý LF (g/cm ²)	0,105 (0,096-0,118)	0,172 (0,096-0,204)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,131 (0,112-0,170)	0,202 (0,132-0,221)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,083 (0,073-0,100)	0,153 (0,071-0,218)
Distální část LF (g/cm ²)	0,072 (0,066-0,076)	0,151 (0,066-0,160)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin, potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota

LF, levý femur

Tabulka 11: Vliv amlodipinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.

Mechanické vlastnosti kostní tkáně	aqua pro inj.	amlodipin
Levý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-37)	37 (36-38)
Průměr femuru (mm)	3,55 (3,51-3,60)	3,52 (3,48-3,54)
Three-point bending (N)	174 (168-191)	174 (165-195)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (119-161)	143 (127-184)
Pravý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-38)	38 (36-39)
Průměr femuru (mm)	3,38 (3,31-3,44)	3,53 (3,43-3,56)*
Three-point bending (N)	192 (173-205)	185 (182-195)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (96-154)	139 (112-167)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin, potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (* p<0,05; p=0,013)

Obrázek 11: Vliv amlodipinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.

kontrola, kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin, potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

BMP-2, kostní morfogenetický protein 2

4.3.2 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar

Vlivem orchidektomie došlo k poklesu tělesné hmotnosti potkanů na začátku i na konci experimentu v porovnání se skupinou sham (tabulka 12).

Po 12 týdnech amlodipin u orchidektomovaných potkanů neměl vliv na stavbu těla, a ani na hladinu vápníku v séru a v tibii v porovnání s kontrolou (tabulka 13, graf 9).

Amlodipin způsobil pokles koncentrací markerů kostního obratu – CTX-I, PINP, BALP, BMP-2, OPG v porovnání s kontrolou. Naopak u kontrolní skupiny byl prokázán statisticky významný nárůst koncentrací CTX-I, BALP, BMP-2 vs. sham. Pod vlivem amlodipinu došlo k signifikantnímu nárůstu IGF-1 v séru vs. kontrola. Koncentrace IGF-1 vlivem orchidektomie statisticky významně klesla u kontroly vs. sham (graf 10).

Orchidektomie signifikantně snížila BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a obou femurů vs. sham. Na samotných femurech byl prokázán signifikantní pokles pouze celého pravého femuru a jeho diafýzy vs. sham. U skupiny amlodipin byla zjištěna signifikantně vyšší hodnota celotělové BMD v porovnání s kontrolou (graf 11, tabulka 14).

Orchidektomie měla negativní vliv na růst a vývoj kostí. U skupiny amlodipin byl zjištěn signifikantně větší průměr a tloušťka kortikální kosti a zvětšila se maximální tlaková síla nutná ke zlomení diafýzy pouze u levého femuru vs. kontrola. U pravého femuru tyto parametry vykazují stejnou tendenci jako u levého, ale bez signifikance (graf 12, 13).

Tabulka 12: Vliv orchidektomie a amlodipinu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.

	sham	kontrola	amlodipin
Hmotnost na začátku pokusu (g)	229±12	220±9	214±4^b
Hmotnost na konci pokusu (g)	569±58	496±27^b	507±27^b

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině sham (^b p<0,01).

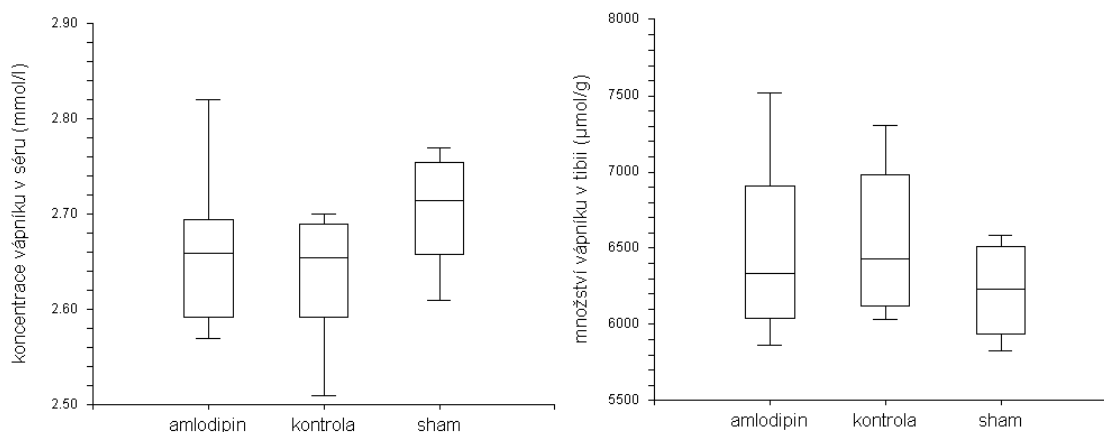
Tabulka 13: Vliv orchidektomie a amlodipinu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.

	sham	kontrola	amlodipin
Svalová tkáň (g)	416 (374-428)^a	335 (317-361)	352 (328-385)
Tuková tkáň (g)	68 (55-84)	86 (65-99)	73 (55-80)
Tuková tkáň (%)	14 (13-17)^b	20 (17-23)	17 (13-19)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

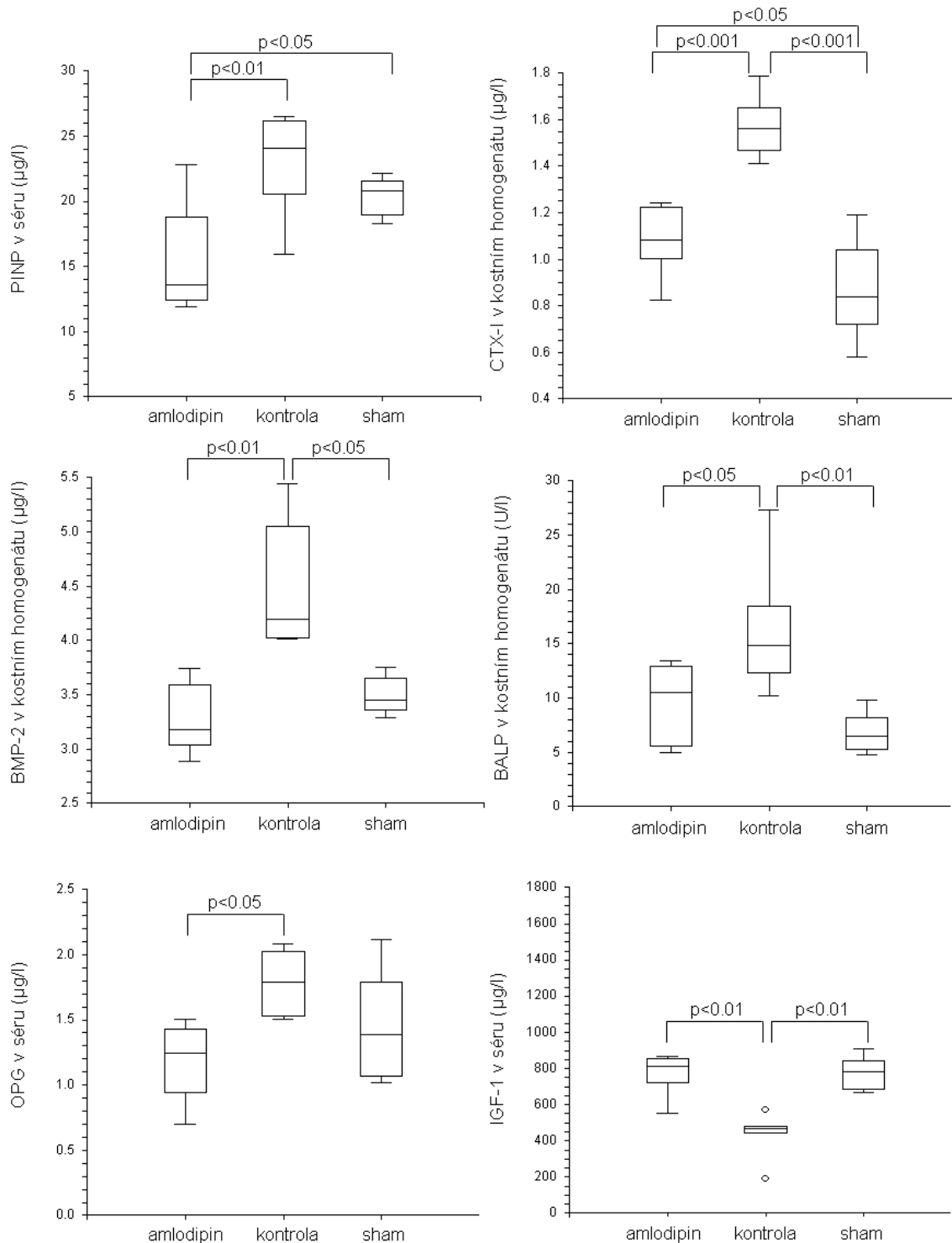
sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 12 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01).

Graf 9: Vliv orchidektomie a amlodipinu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibi.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

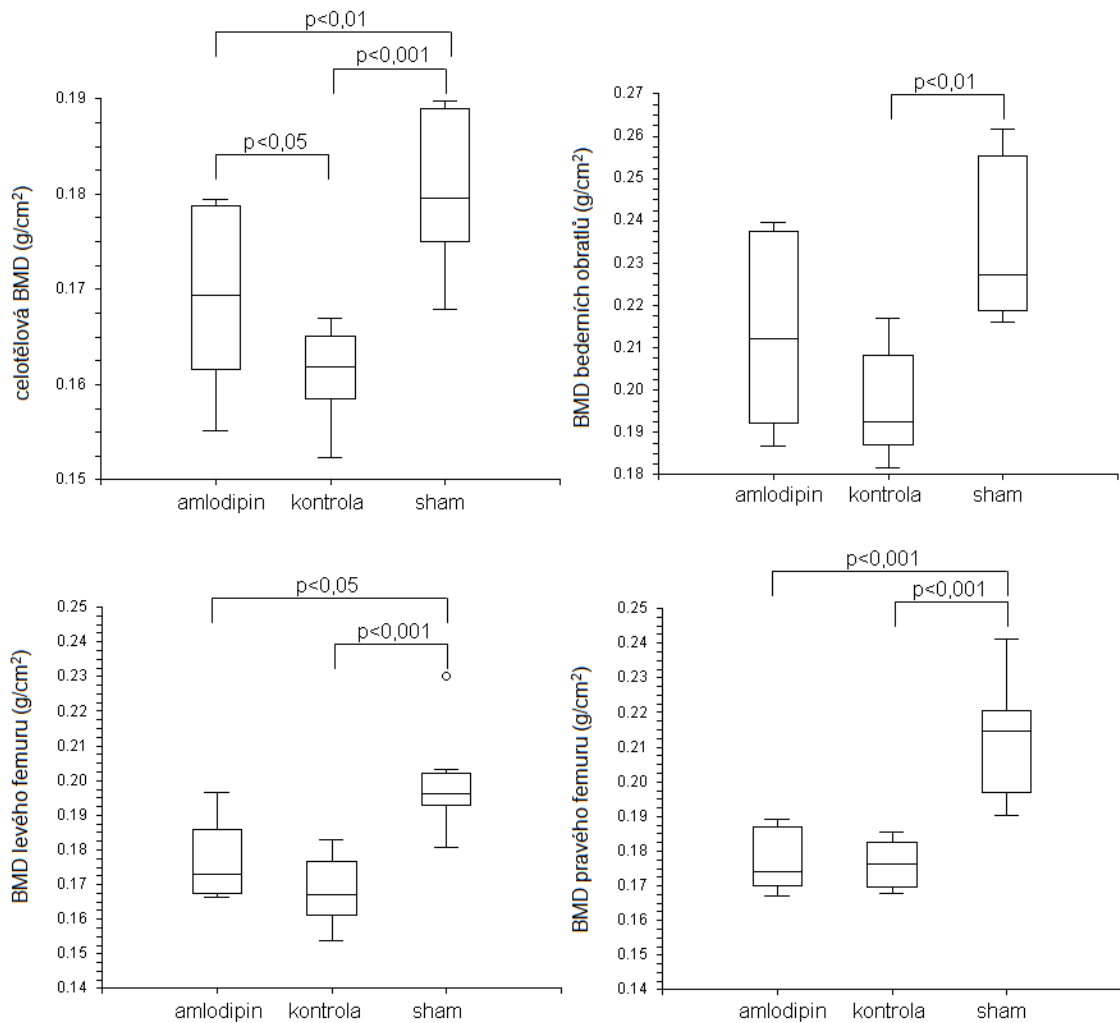
sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Graf 10: Vliv orchidektomie a amlodipinu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 11: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Tabulka 14: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.

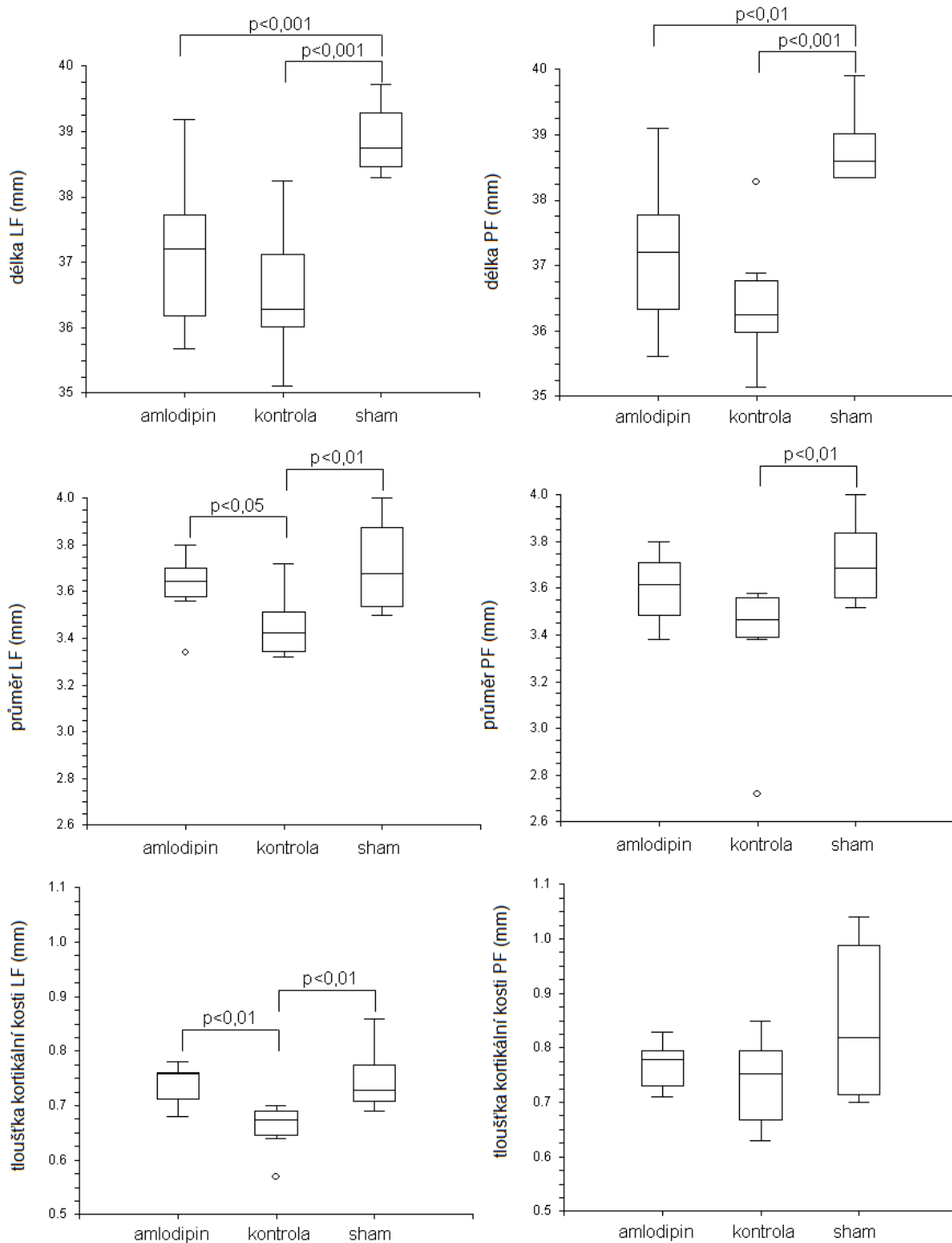
	sham	kontrola	amlodipin
Celý LF (g/cm ²)	0,090 (0,086-0,112)	0,089 (0,073-0,108)	0,096 (0,071-0,111)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,114 (0,103-0,143)	0,112 (0,091-0,124)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,075 (0,066-0,095)	0,063 (0,045-0,076)	0,072 (0,049-0,087)
Celý PF (g/cm ²)	0,093 (0,085-0,110)^b	0,078 (0,067-0,086)	0,083 (0,074-0,092)
Proximální část PF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,090 (0,088-0,108)	0,103 (0,091-0,123)
Diafýza PF (g/cm ²)	0,078 (0,076-0,087)^b	0,057 (0,045-0,076)	0,062 (0,049-0,071)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01).

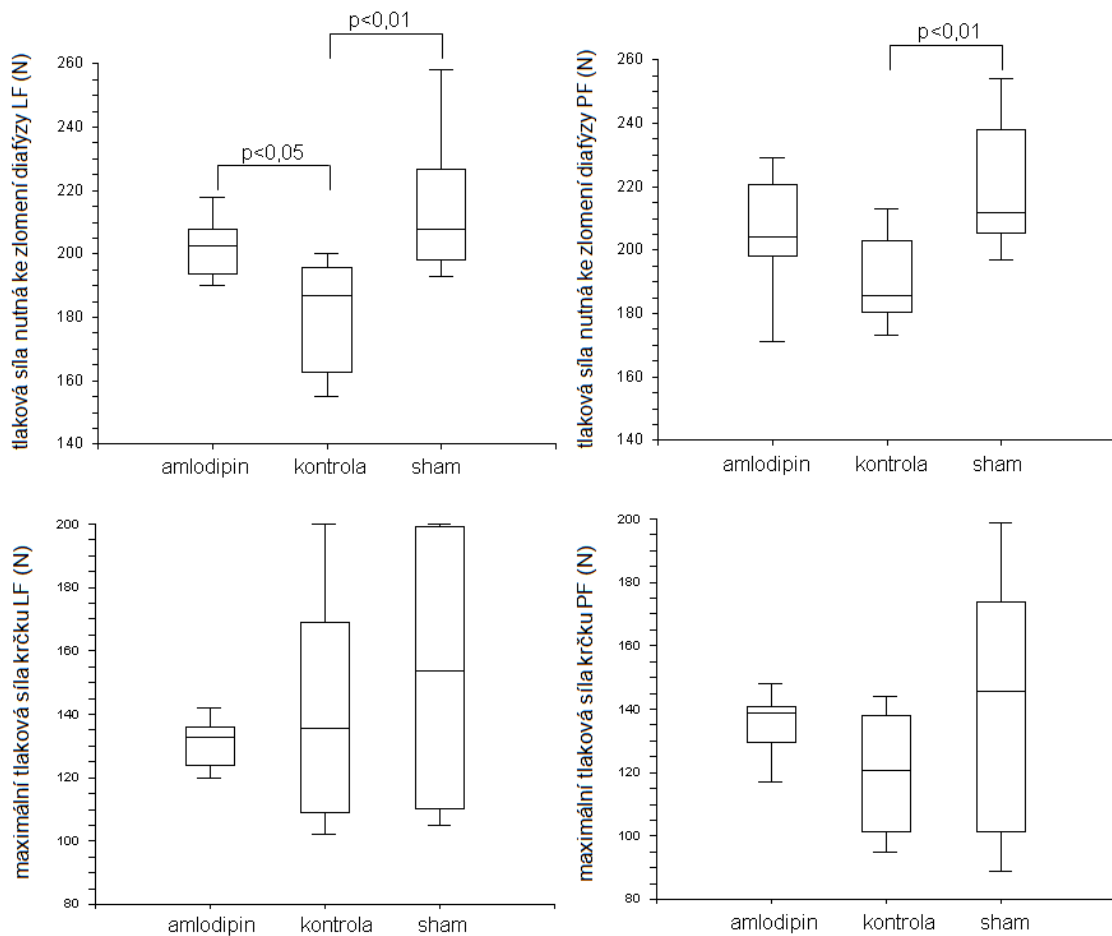
Graf 12: Vliv orchidektomie a amlodipinu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 13: Vliv orchidektomie a amlodipinu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 3 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

4.3.3 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů

Vlivem orchidektomie nedošlo k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti u spontánně hypertenzních potkanů na začátku a na konci experimentu v porovnání s sham (tabulka 15). Po 12 týdnech ale orchidektomie způsobila statisticky významný pokles tukové tkáně vs. sham (tabulka 16).

Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v koncentraci vápníku v séru a v tibií mezi skupinami (graf 14).

Vlivem orchidektomie došlo k zvýšení kostního obrátu, které bylo prokázáno nárůstem koncentrací – PINP, CTX-I, BMP-2, BALP v porovnání se skupinou sham. U skupiny amlodipin byl zaznamenán signifikantní pokles CTX-I a BMP-2 vs. kontrola. Signifikantně nižší koncentrace IGF-1 byla naměřena u kontroly vs. sham (graf 15).

Hustota kostního minerálu byla u kontrolní skupiny statisticky významně snížena ve všech hodnocených oblastech skeletu a vypreparovaných femurech v porovnání s sham. Po podávání amlodipinu nedošlo k statisticky významné změně BMD vs. kontrola (tabulka 17).

Hodnocením mechanických vlastností femurů nebyly prokázány signifikantní změny mezi skupinami. Pouze délka pravého femuru byla statisticky významně menší u kontroly vs. sham. Délka levého femuru byla též menší, ale bez statistické významnosti (tabulka 18).

Tabulka 15: Vliv orchidektomie a amlodipinu na tělesnou hmotnost spontánně hypertenzní potkanů na začátku a na konci experimentu.

	sham	kontrola	amlodipin
Hmotnost na začátku pokusu (g)	232±20	220±10	224±10
Hmotnost na konci pokusu (g)	342±26	323±18	331±16

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

Tabulka 16: Vliv orchidektomie a amlodipinu u spontánně hypertenzních potkanů na stavbu těla.

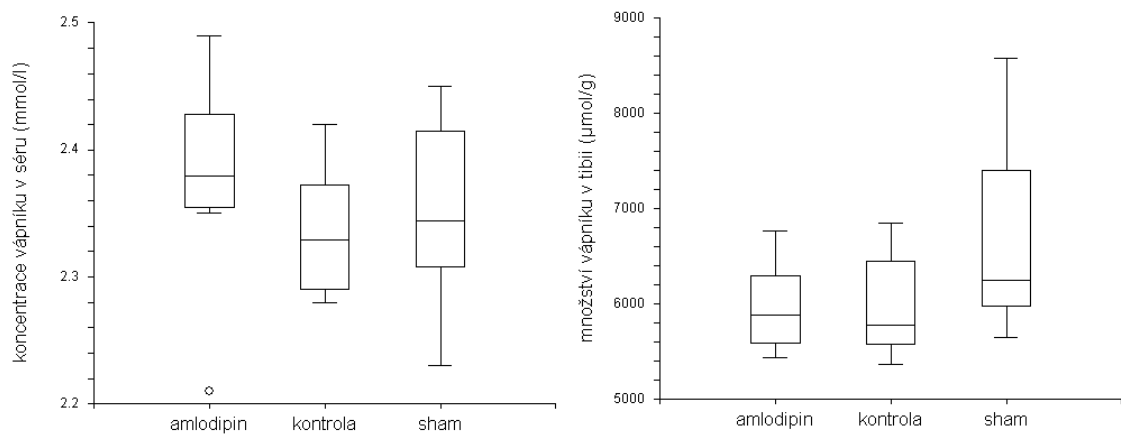
	sham	kontrola	amlodipin
Svalová tkáň (g)	254±23	257±17	254±12
Tuková tkáň (g)	34±4^b	29±2	30±3
Tuková tkáň (%)	12±1^b	10±1	11±1

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01).

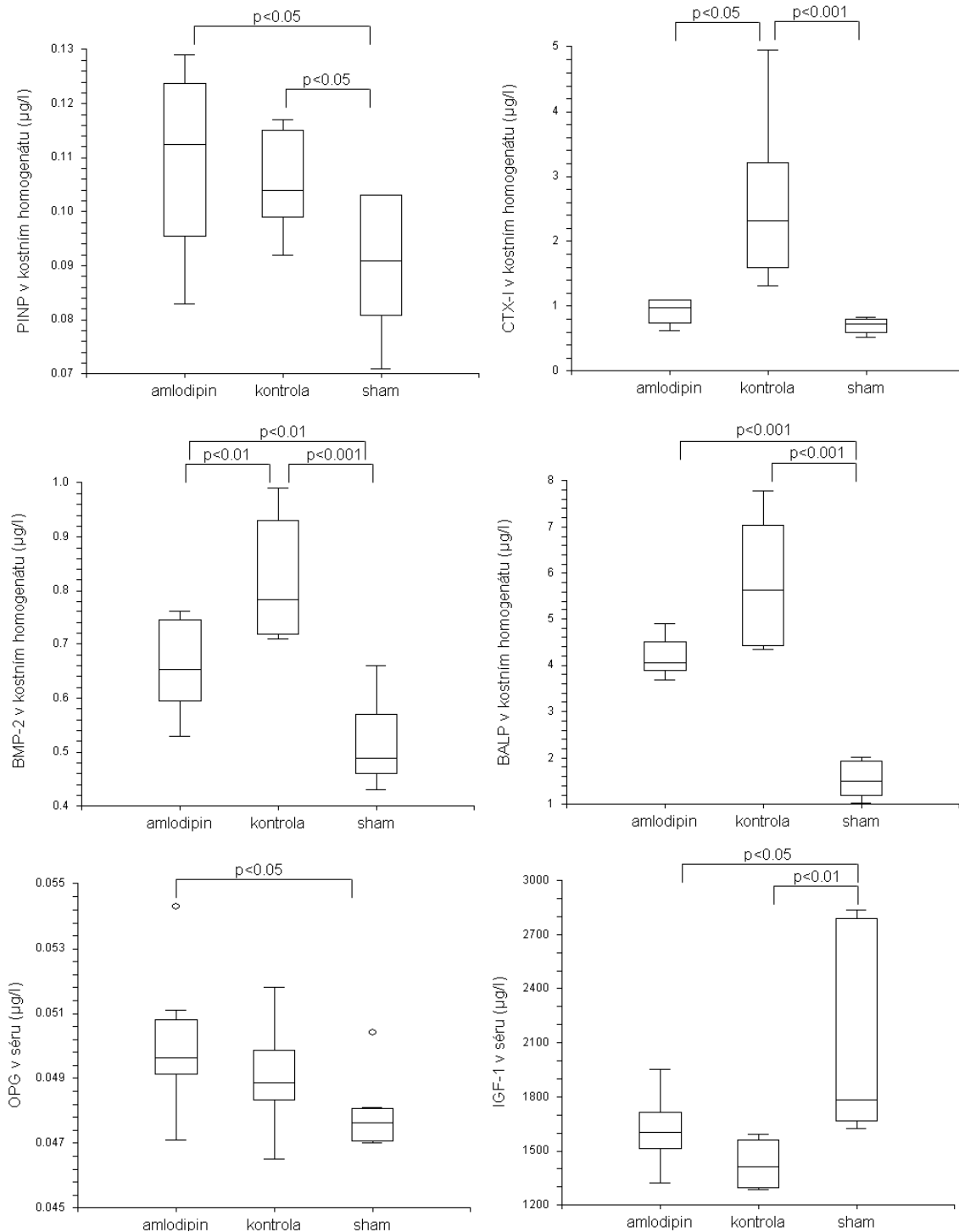
Graf 14: Vliv orchidektomie a amlodipinu u spontánně hypertenzních potkanů na koncentrace vápníku v séru a v tibiai.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkaní, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

Graf 15: Vliv orchidektomie a amlodipinu na koncentraci kostních markerů u spontánně hypertenzních potkanů.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), $n=8$.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Tabulka 17: Vliv orchidektomie a amlodipinu na kostní minerální hustotu u spontánně hypertenzních potkanů.

	sham	kontrola	amlodipin
BMD celého těla (g/cm ²)	0,170±0,007^a	0,159±0,003	0,158±0,003
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,227±0,012^a	0,203±0,007	0,198±0,014
BMD v oblasti LF (g/cm ²)	0,178±0,013^b	0,159±0,008	0,158±0,009
Celý LF (g/cm ²)	0,073±0,006^a	0,057±0,006	0,061±0,008
Proximální část LF (g/cm ²)	0,074±0,006^a	0,055±0,007	0,059±0,009
Diafýza LF (g/cm ²)	0,072±0,013^c	0,059±0,009	0,060±0,010
BMD v oblasti PF (g/cm ²)	0,182±0,018^a	0,158±0,007	0,158±0,006
Celý PF (g/cm ²)	0,079±0,008^b	0,066±0,009	0,064±0,003
Proximální část PF (g/cm ²)	0,076±0,009^b	0,063±0,008	0,060±0,006
Diafýza PF (g/cm ²)	0,081±0,014^c	0,067±0,012	0,065±0,012

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05).

Tabulka 18: Vliv orchidektomie a amlodipinu na parametry a pevnost femurů u spontánně hypertenzních.

	sham	kontrola	amlodipin
Délka LF (mm)	34,1 (33,7-34,4)	33,6 (32,6-33,9)	33,7 (33,5-33,9)
Délka PF (mm)	34,3 (33,9-34,5)^b	33,6 (32,9-33,8)	33,6 (33,1-33,6)
Průměr LF (mm)	3,22 (3,15-3,34)	3,25 (3,15-3,30)	3,32 (3,24-3,43)
Průměr PF (mm)	3,14 (3,11-3,36)	3,22 (3,14-3,24)	3,23 (3,10-3,36)
Tloušťka kortikální kosti LF (mm)	0,60 (0,56-0,64)	0,65 (0,55-0,66)	0,62 (0,59-0,65)
Tloušťka kortikální kosti PF (mm)	0,62 (0,58-0,66)	0,58 (0,53-0,60)	0,57 (0,55-0,59)
Three-point bending LF (N)	150 (130-180)	176 (146-178)	151 (148-174)
Three-point bending PF (N)	155 (137-160)	149 (125-153)	139 (134-160)
Max. tlaková síla krčku LF (N)	130 (113-146)	133 (127-144)	142 (134-149)
Max tlaková síla krčku PF (N)	134 (126-143)	131 (120-147)	128 (115-142)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; amlodipin, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván amlodipin v dávce 2,5 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01).

4.4 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů

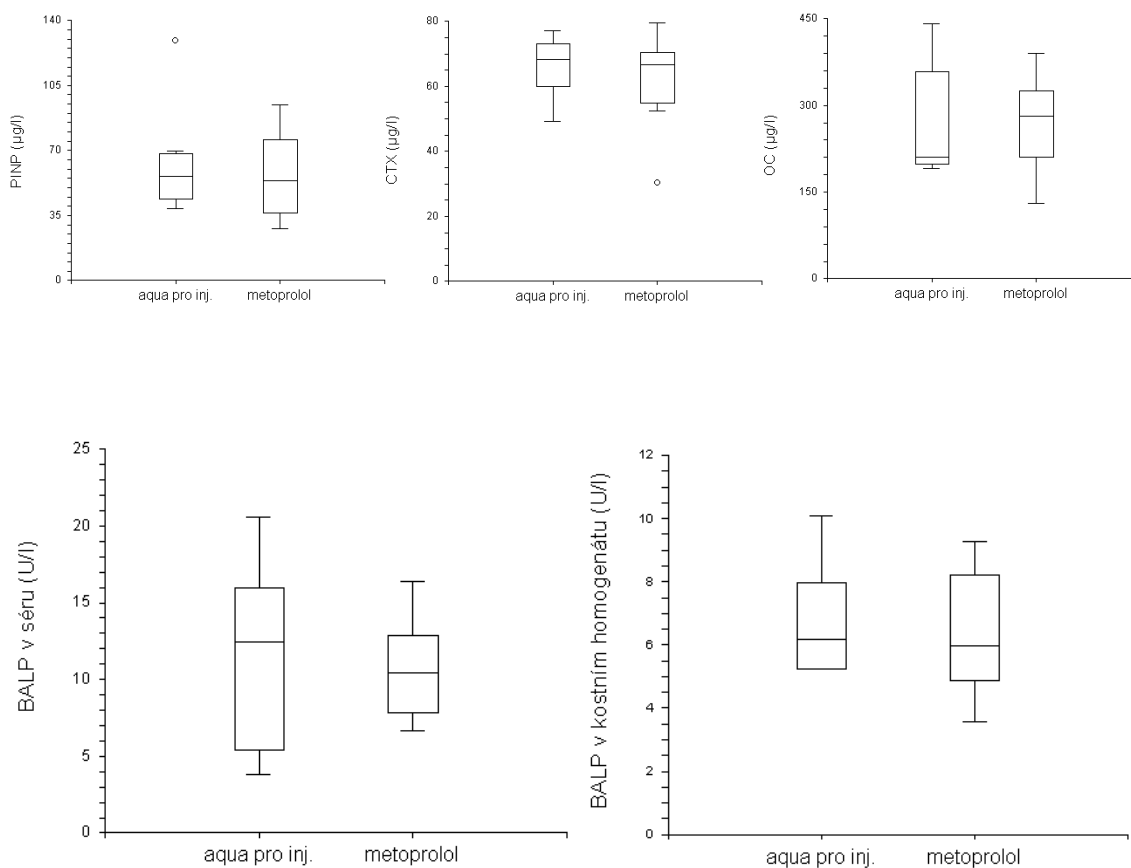
4.4.1 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

Po 8 týdnech podávání metoprololu v dávce 5 mg/kg BW zdravým samcům potkanů kmene Wistar nedošlo k významnému ovlivnění koncentrací kostních markerů (graf 16) a hustoty kostního minerálu (tabulka 19) v porovnání s kontrolní skupinou.

Metoprolol způsobil statisticky významný pokles maximální tlakové síly nutné ke zlomení krčku pravého femuru vs. kontrola. Hodnoty získané u levého femuru ale tento výsledek nepotvrdily. V ostatních sledovaných parametrech femurů nebyly nalezeny významné změny mezi skupinami (tabulka 20).

U skupiny metoprolol bylo prokázáno zvýšení koncentrace BMP-2 v proximální části tibie v porovnání s kontrolní skupinou (obrázek 16).

Graf 16: Vliv metoprololu na koncentraci kostních markerů v séru u potkanů kmene Wistar.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; metoprolol, potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 5 mg/kg/den.

Tabulka 19: Vliv metoprololu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

	aqua pro inj.	metoprolol
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,218 (0,213-0,234)	0,219 (0,199-0,227)
BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	0,218 (0,217-0,233)	0,229 (0,224-0,236)
BMD femuru (g/cm ²)	0,175 (0,171-0,210)	0,200 (0,193-0,206)
Celý LF (g/cm ²)	0,095 (0,080-0,155)	0,088 (0,083-0,155)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,115 (0,086-0,164)	0,102 (0,088-0,175)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,079 (0,064-0,159)	0,078 (0,067-0,160)
Distální část LF (g/cm ²)	0,069 (0,039-0,153)	0,072 (0,048-0,136)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; metoprolol, potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 5 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota

LF, levý femur

Tabulka 20: Vliv metoprololu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.

Mechanické vlastnosti kostní tkáně	aqua pro inj.	metoprolol
Levý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-37)	36 (36-37)
Průměr femuru (mm)	3,52 (3,50-3,60)	3,53 (3,50-3,65)
Three-point bending (N)	174 (167-189)	175 (166-187)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	151 (140-164)	143 (131-153)
Pravý femur		
Délka femuru (mm)	37 (37-38)	38 (37-38)
Průměr femuru (mm)	3,4 (3,4-3,5)	3,5 (3,4-3,5)
Three-point bending (N)	200 (184-205)	178 (172-198)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	157 (151-175)	127 (112-142)**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; metoprolol, potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (** p<0,01; p=0,002)

Obrázek 12: Vliv metoprololu na hladinu BMP- 2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.

kontrola, kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; metoprolol, potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 5 mg/kg/den.
BMP-2, kostní morfogenetický protein 2

4.4.2 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar

Orchidektomie vedla k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti na začátku pokusu u skupiny metoprolol a nesignifikantní pokles u kontroly vs. sham. Na konci experimentu vlivem orchidektomie došlo k statisticky významnému poklesu u skupiny metoprolol a kontrola vs. sham. Metoprolol v dávce 54 mg/kg BW po 12 týdnech podávání způsobil signifikantní pokles tělesné hmotnosti vs. kontrola (tabulka 21).

Vlivem orchidektomie také došlo k signifikantnímu poklesu množství svalové tkáně u kontrolní skupiny a u skupiny metoprolol ($p < 0,001$), a procentuálnímu nárůstu tkáně tukové u skupiny metoprolol ($p < 0,01$) vs. sham. Metoprolol způsobil po 12 týdnech podávání další signifikantní pokles množství svalové tkáně vs. kontrola (tabulka 22).

Ani orchidektomie, ani metoprolol signifikantně neovlivnily koncentrace vápníku v séru a v tibii (graf 17).

Stanovením koncentrací markerů kostního obratu (CTX-I, BMP-2 a BALP) byl zjištěn signifikantní nárůst u potkanů po provedené orchidektomii vs. sham. Hladina PINP a OPG statisticky nevýznamně vzrostla v porovnání s sham. Po podávání metoprololu došlo k signifikantnímu poklesu CTX-I, PINP, BMP-2 a OPG, u BALP byl zaznamenán také patrný pokles, který ale nebyl statisticky významný vs. kontrola. Sérová hladina IGF-1 statisticky významně klesla u kontroly vs. sham. Naopak u skupiny metoprolol signifikantně vzrostla v porovnání s kontrolou, ale nedosáhla srovnatelné hladiny s sham. Výsledky jsou prezentovány v grafu 18.

U potkanů po orchidektomii bylo prokázáno signifikantní snížení BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a obou femurů v porovnání s sham. Po podání metoprololu nedošlo k signifikantní změně vs. kontrola (graf 19, tabulka 23).

U kontroly byla statisticky významně kratší délka, slabší průměr i tloušťka kortikální části levého i pravého femuru v porovnání s sham. Po podání metoprololu nebyl prokázán nárůst sledovaných parametrů femuru vs. kontrola. Testování mechanické odolnosti kostní tkáně pomocí three-point bending testu ukázalo statisticky významný pokles tlakové síly nutné ke zlomení u kontroly vs. sham. Po podání metoprololu nedošlo k signifikantní změně tlakové síly v oblasti diafýzy femurů v porovnání s kontrolou. Testováním tlakové odolnosti krčku femurů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (graf 20, 21).

Tabulka 21: Vliv orchidektomie a metoprololu na tělesnou hmotnost potkanů kmene Wistar na začátku a na konci experimentu.

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

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti sham (^a p<0,001, ^b p<0,01).

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^c p<0,05).

Tabulka 22: Vliv orchidektomie a metoprololu u potkanů kmene Wistar na stavbu těla.

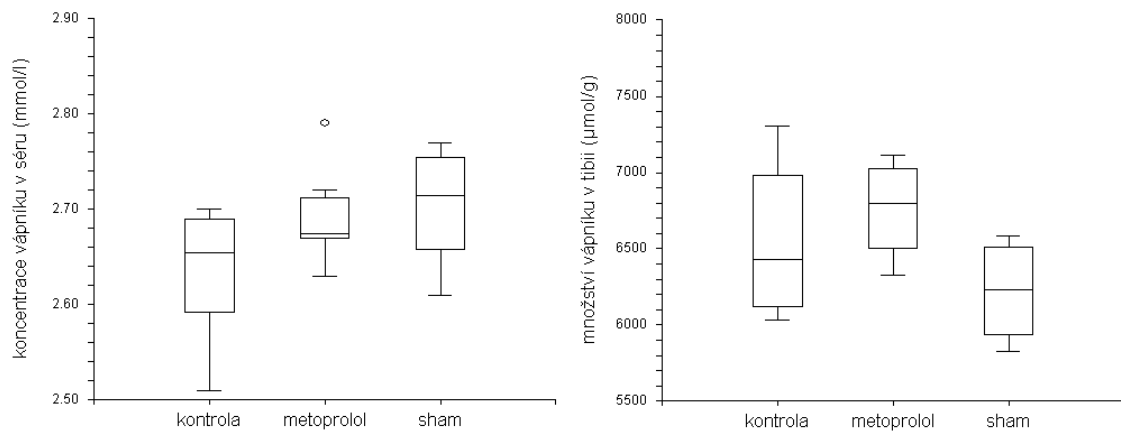
	sham	kontrola	metoprolol
Svalová tkáň (g)	416 (374-428)^a	335 (317-361)	308 (292-326)^c
Tuková tkáň (g)	68 (55-84)	86 (65-99)	68 (56-84)
Tuková tkáň (%)	14 (13-17)^b	20 (17-23)	19 (15-21)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

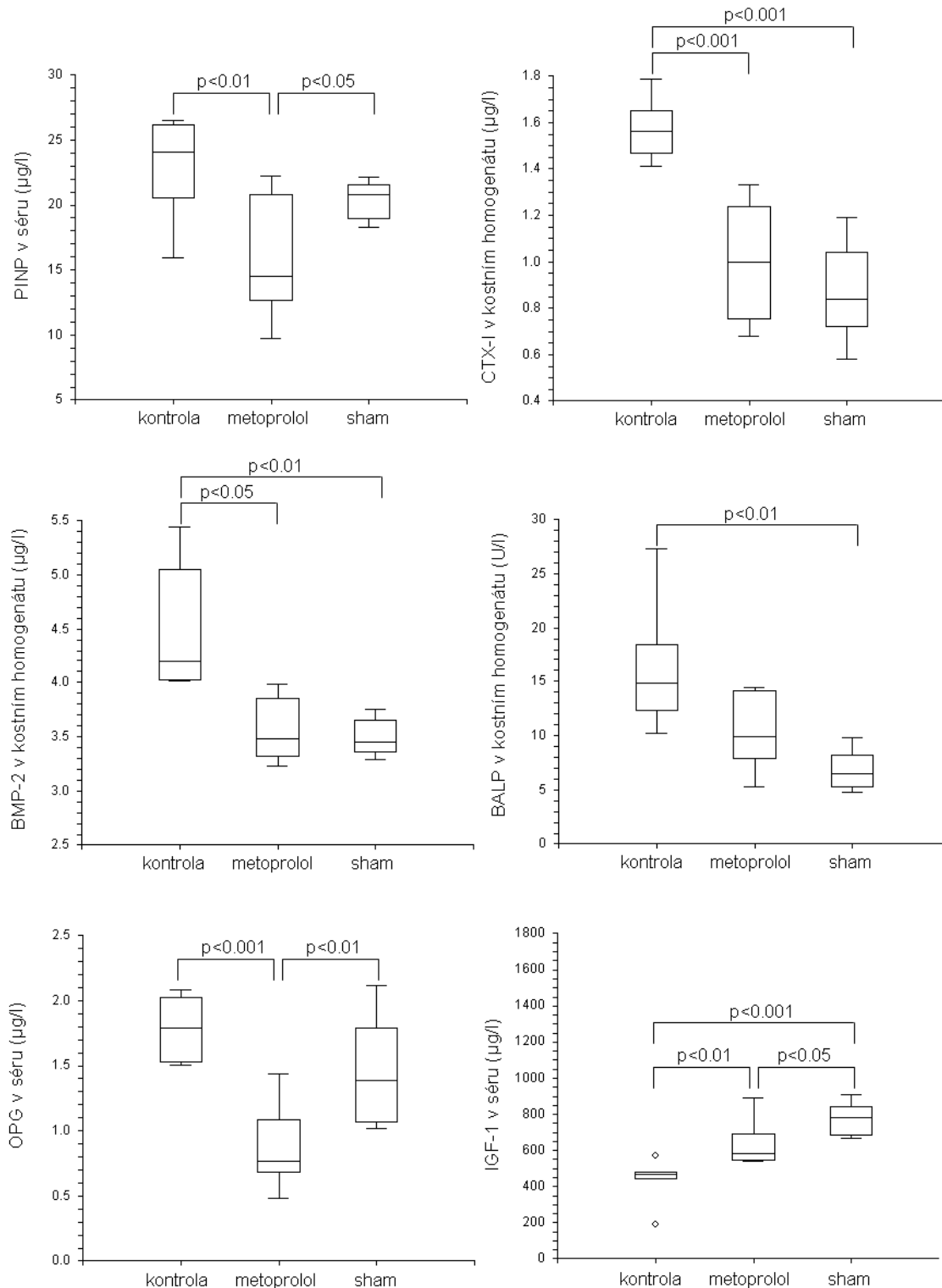
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05).

Graf 17: Vliv orchidektomie a metoprololu u potkanů kmene Wistar na koncentrace vápníku v séru a v tibii.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

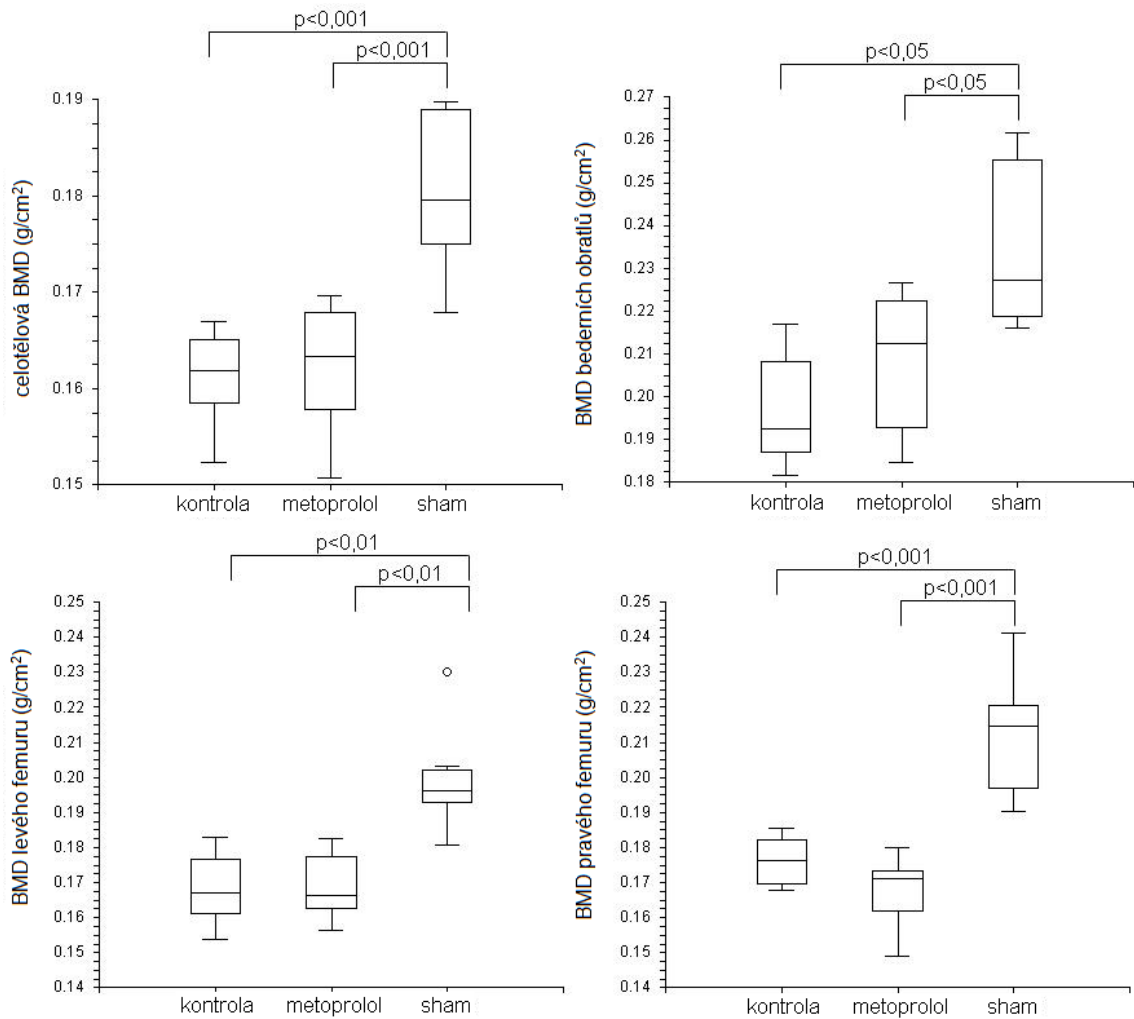
sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

Graf 18: Vliv orchidektomie a metoprololu na koncentraci kostních markerů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), $n=8$.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 19: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Tabulka 23: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu femurů u potkanů kmene Wistar.

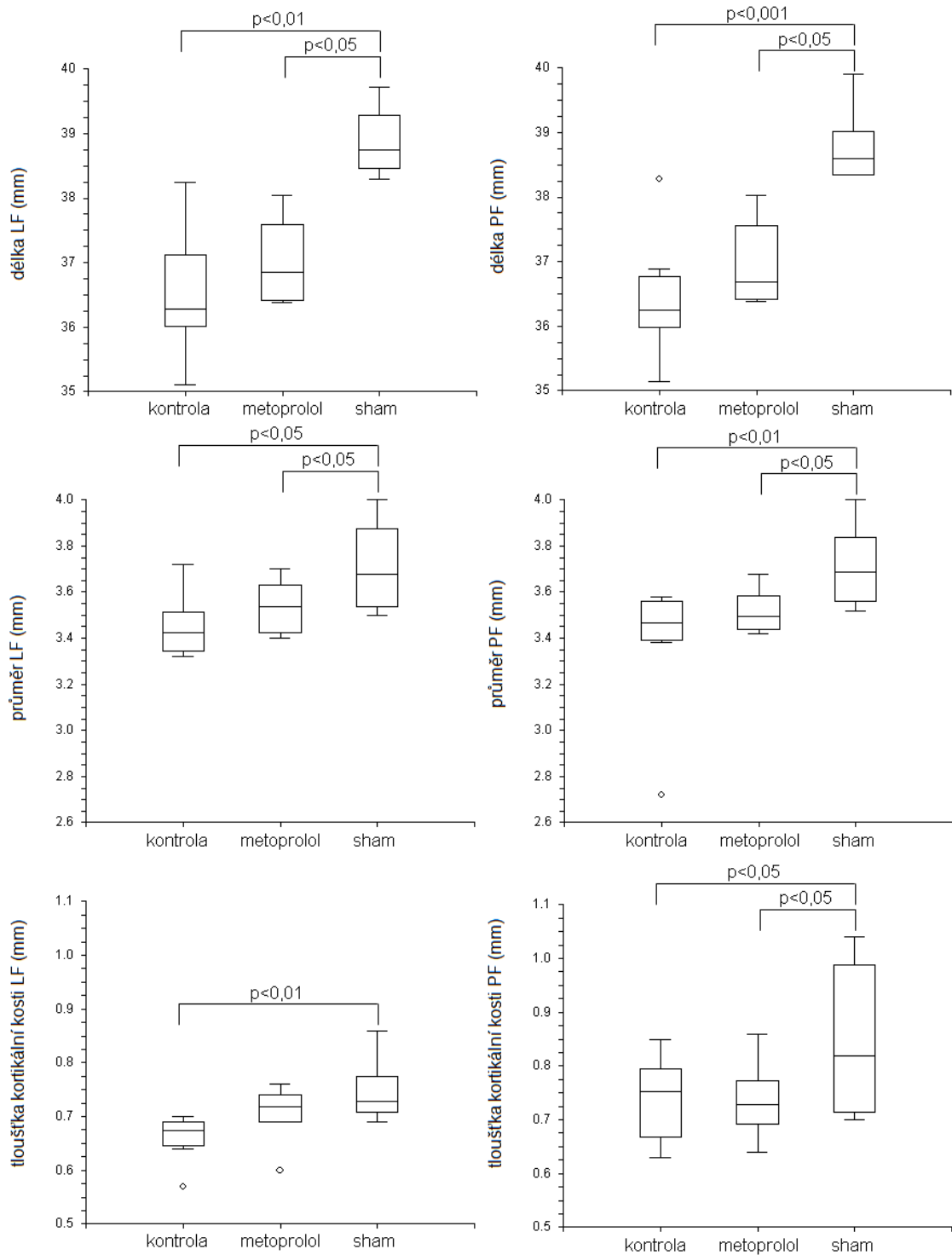
	sham	kontrola	metoprolol
Celý LF (g/cm ²)	0,090 (0,086-0,112)	0,089 (0,073-0,108)	0,087 (0,079-0,092)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,114 (0,103-0,143)	0,114 (0,086-0,120)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,075 (0,066-0,095)^c	0,063 (0,045-0,076)	0,064 (0,059-0,069)
Celý PF (g/cm ²)	0,093 (0,085-0,110)^a	0,078 (0,067-0,086)	0,078 (0,073-0,086)
Proximální část PF (g/cm ²)	0,111 (0,103-0,135)	0,090 (0,088-0,108)	0,089 (0,072-0,103)
Diafýza PF (g/cm ²)	0,078 (0,076-0,087)^b	0,057 (0,045-0,076)	0,061 (0,058-0,071)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05).

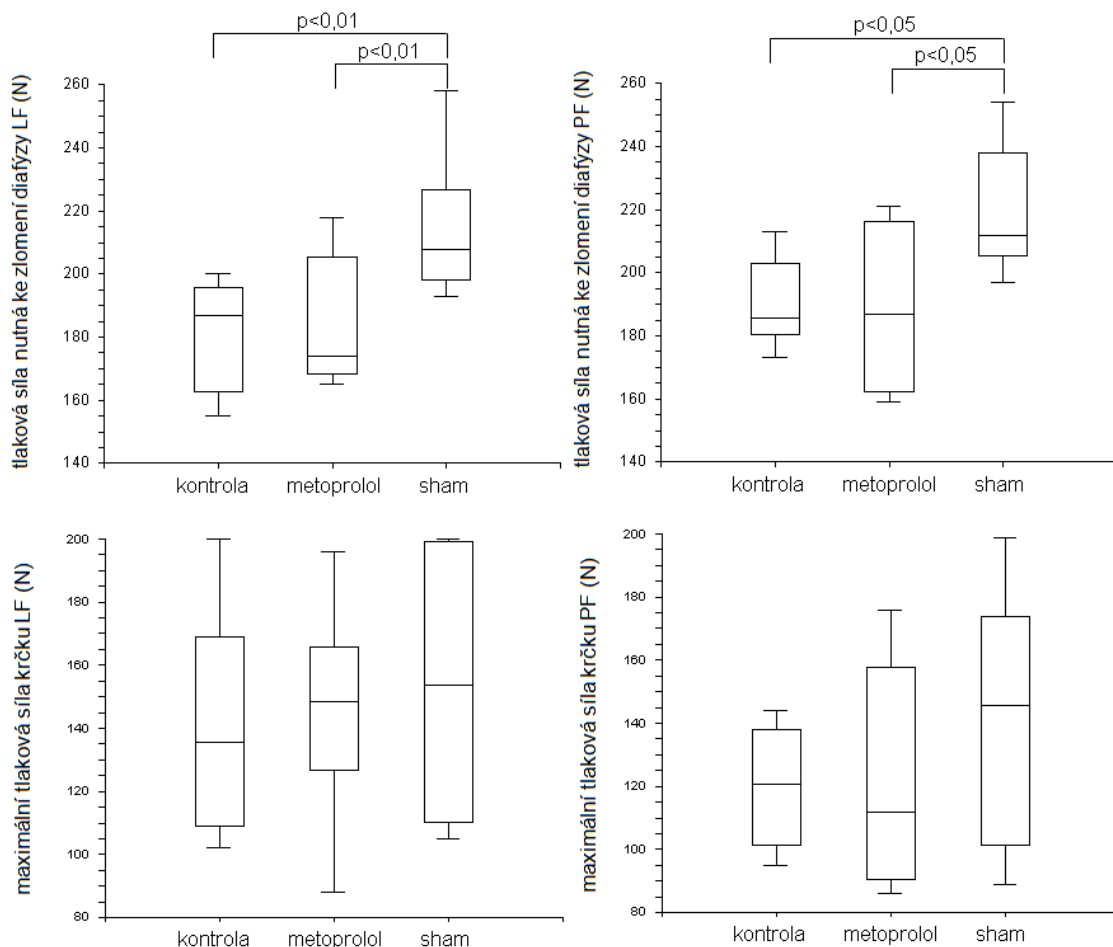
Graf 20: Vliv orchidektomie a metoprololu na parametry femurů u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Graf 21: Vliv orchidektomie a metoprololu na pevnost kostní tkáně u potkanů kmene Wistar.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 54 mg/kg/den.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

4.4.3 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů

Orchidektomie statisticky významně neovlivnila tělesnou hmotnost spontánně hypertenzních potkanů na začátku a na konci experimentu vs. sham (tabulka 24), ale signifikantně snížila po 12 týdnech množství tukové tkáně vs. sham (tabulka 25).

Orchidektomie a metoprolol signifikantně neovlivnily množství vápníku v séru a v tibií mezi skupinami (graf 22).

Koncentrace markerů kostního obratu – PINP, CTX-I, BMP-2, BALP signifikantně vzrostla a sérová hladina IGF-1 klesla vlivem provedené orchidektomie vs. sham. Po 12

týdnech podávání metoprololu byl prokázán signifikantní pokles PINP a nesignifikantní pokles CTX-I, BMP-2 a BALP vs. kontrola (graf 23).

Orchidektomie způsobila signifikantní pokles BMD v hodnocených oblastech skeletu a zpomalila růst femurů do délky se signifikací pouze u pravého femuru, ale neovlivnila jeho mechanické vlastnosti vs. sham. Metoprolol neovlivnil densitu kostního minerálu, délku, průměr, tloušťku kortikalis femuru a jeho mechanické vlastnosti v porovnání s kontrolou (tabulka 26. 27).

Tabulka 24: Vliv orchidektomie a metoprololu na tělesnou hmotnost spontánně hypertenzních potkanů na začátku a na konci experimentu.

	sham	kontrola	metoprolol
Hmotnost na začátku pokusu (g)	232±20	220±10	218±14
Hmotnost na konci pokusu (g)	342±26	323±18	331±17

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

Tabulka 25: Vliv orchidektomie a metoprololu u spontánně hypertenzních potkanů na stavbu těla.

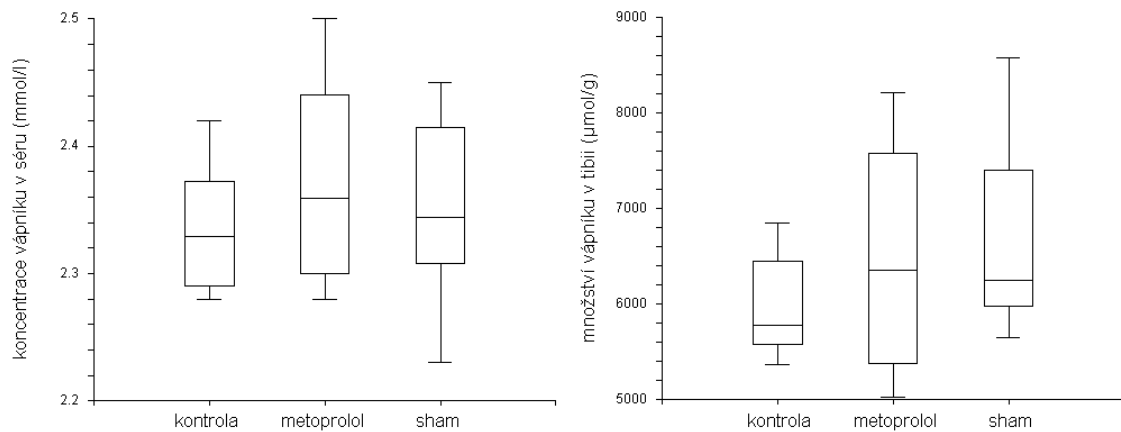
	sham	kontrola	metoprolol
Svalová tkáň (g)	254±23	257±17	253±14
Tuková tkáň (g)	34±4^b	29±2	29±3
Tuková tkáň (%)	12±1^b	10±1	10±1

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01).

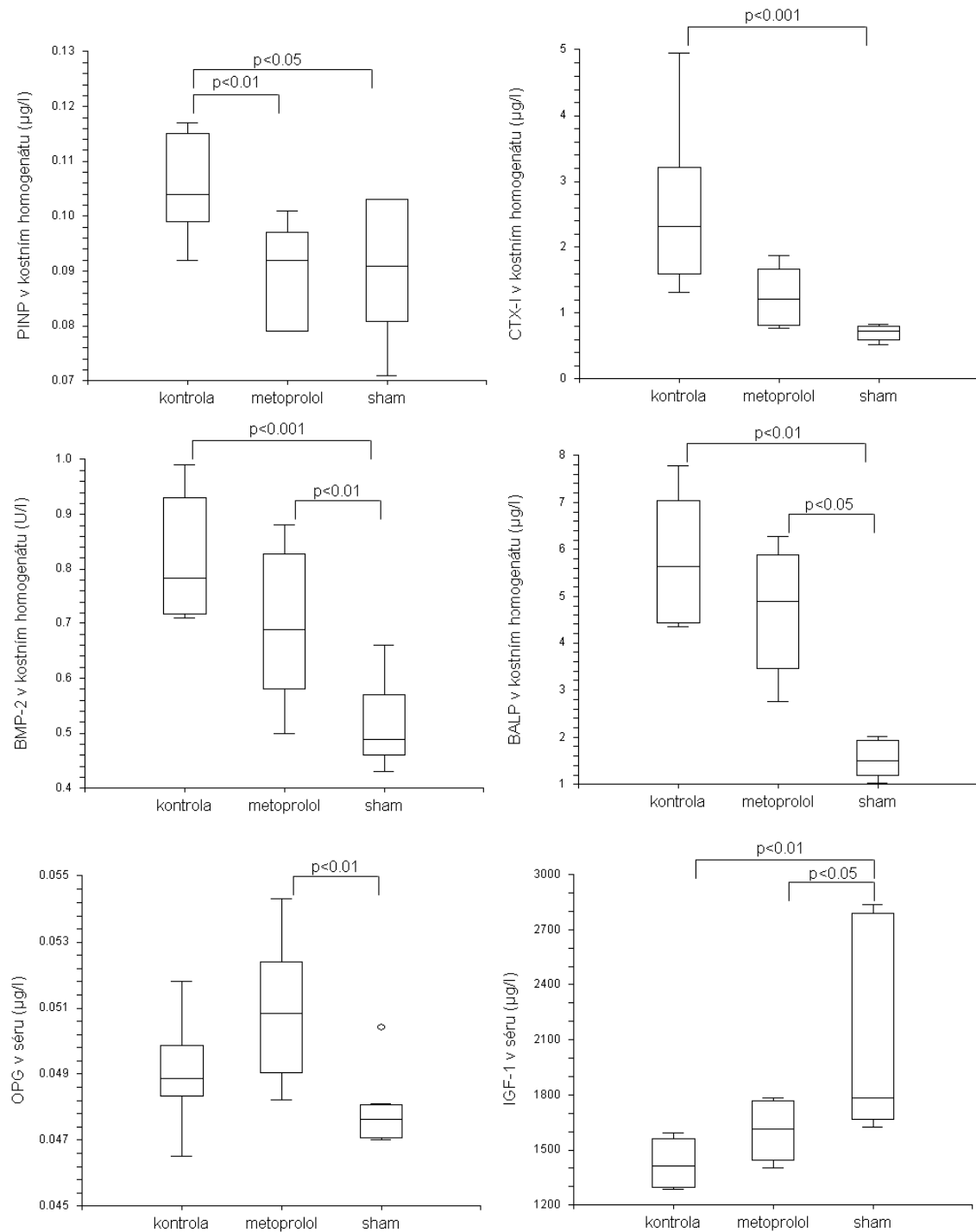
Graf 22: Vliv orchidektomie a metoprololu u spontánně hypertenzních potkanů na koncentrace vápníku v séru a v tibií.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

Graf 23: Vliv orchidektomie a metoprololu na koncentraci kostních markerů u spontánně hypertenzních potkanů.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou graficky znázorněny.

Tabulka 26: Vliv orchidektomie a metoprololu na kostní minerální hustotu u spontánně hypertenzních potkanů.

	sham	kontrola	metoprolol
BMD celého těla (g/cm ²)	0,170±0,007^a	0,159±0,003	0,158±0,004
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,227±0,012^a	0,203±0,007	0,198±0,007
BMD v oblasti LF (g/cm ²)	0,178±0,013^b	0,159±0,008	0,159±0,008
Celý LF (g/cm ²)	0,073±0,006^a	0,057±0,006	0,059±0,007
Proximální část LF (g/cm ²)	0,074±0,006^a	0,055±0,007	0,059±0,009
Diafýza LF (g/cm ²)	0,072±0,013^c	0,059±0,009	0,058±0,005
BMD v oblasti PF (g/cm ²)	0,182±0,018^a	0,158±0,007	0,160±0,007
Celý PF (g/cm ²)	0,079±0,008^b	0,066±0,009	0,065±0,007
Proximální část PF (g/cm ²)	0,076±0,009^b	0,063±0,008	0,062±0,010
Diafýza PF (g/cm ²)	0,081±0,014^c	0,067±0,012	0,068±0,008

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05).

Tabulka 27: Vliv orchidektomie a metoprololu na parametry a pevnost femurů u spontánně hypertenzních potkanů.

	sham	kontrola	metoprolol
Délka LF (mm)	34,1 (33,7-34,4)	33,6 (32,6-33,9)	33,5 (33,2-34,1)
Délka PF (mm)	34,3 (33,9-34,5)^b	33,6 (32,9-33,8)	33,5 (33,2-34,3)
Průměr LF (mm)	3,22 (3,15-3,34)	3,25 (3,15-3,30)	3,31 (3,24-3,40)
Průměr PF (mm)	3,14 (3,11-3,36)	3,22 (3,14-3,24)	3,15 (3,13-3,24)
Tloušťka kortikální kosti LF (mm)	0,60 (0,56-0,64)	0,65 (0,55-0,66)	0,60 (0,58-0,62)
Tloušťka kortikální kosti PF (mm)	0,62 (0,58-0,66)	0,58 (0,53-0,60)	0,57 (0,53-0,59)
Three-point bending LF (N)	150 (130-180)	176 (146-178)	152 (135-161)
Three-point bending PF (N)	155 (137-160)	149 (125-153)	151 (144-153)
Max. tlaková síla krčku LF (N)	130 (113-146)	133 (127-144)	131 (126-134)
Max tlaková síla krčku PF (N)	134 (126-143)	131 (120-147)	123 (111-129)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

sham, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; kontrola, kontrolní skupina po oboustranné orchidektomii bez léčby; metoprolol, orchidektomovaní potkani, kterým byl podáván metoprolol v dávce 50 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (^b p<0,01)

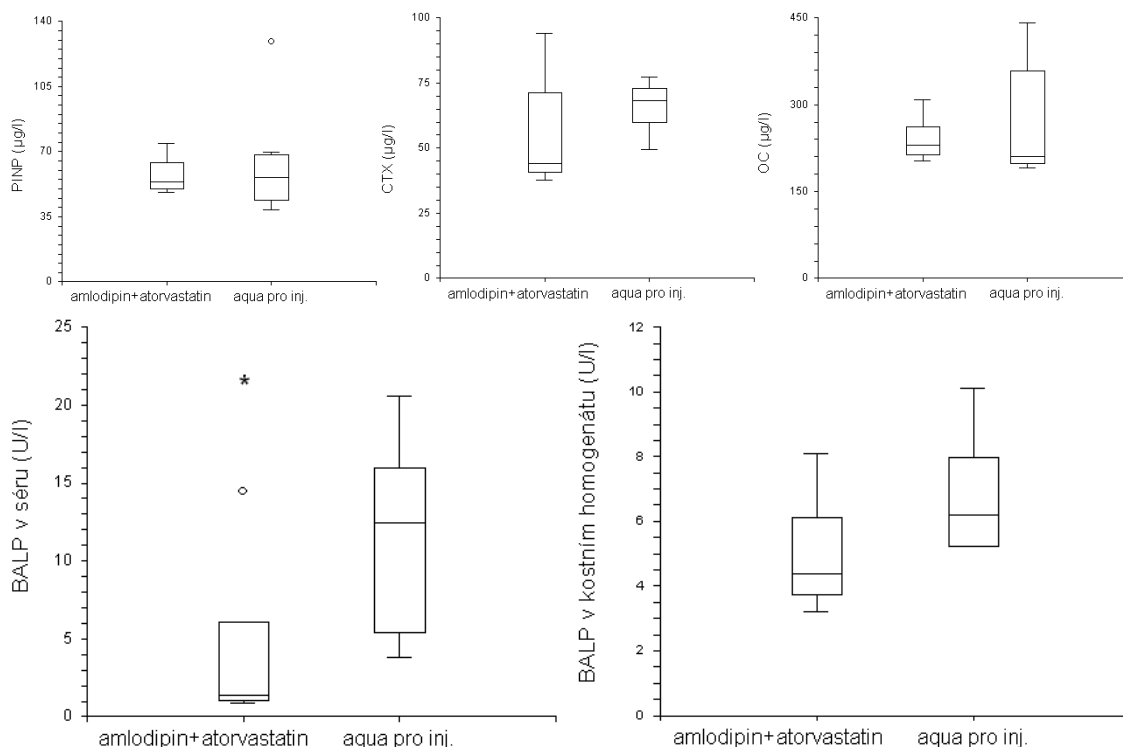
4.5 Vliv kombinace léčiv amlodipinu a atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů

4.5.1 Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

Po 8 týdnech podávání kombinace léčiv amlodipinu+ atorvastatinu zdravým samcům potkanů kmene Wistar se signifikantně snížila hladina BALP na 34 % ($p=0,03$) v séru vs. kontrola. V kostním homogenátu byl také zjištěn pokles hladiny BALP, ale bez statistické významnosti v porovnání s kontrolou (graf 24).

Kombinace léků statisticky významně neovlivnila množství BMD v hodnocených oblastech a mechanické vlastnosti femuru vs. kontrola (tabulka 28, 29). Po 8 týdnech byl pravý femur signifikantně delší než u kontrolní skupiny. Délka levého femuru byla též větší, ale bez požadované signifikance (tabulka 29).

Podávání kombinace léků způsobilo nárůst hladiny BMP-2 v proximální tibii v porovnání s kontrolní skupinou (obrázek 17).

Graf 24: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na koncentraci kostních markerů v séru u potkanů**kmene Wistar.**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin+atorvastatin, potkani, kterým byla podávána kombinace amlodipinu a atorvastatin, každý v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (*p<0,05)

BALP v séru (p=0,03)

Tabulka 28: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na kostní minerální hustotu u potkanů kmene Wistar.

	aqua pro inj.	amlodipin+atorvastatin
BMD bederních obratlů (g/cm ²)	0,218 (0,213-0,234)	0,219 (0,217-0,225)
BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	0,218 (0,217-0,233)	0,229 (0,215-0,236)
BMD femuru (g/cm ²)	0,187 (0,175-0,210)	0,181 (0,163-0,201)
Celý LF (g/cm ²)	0,095 (0,080-0,155)	0,088 (0,083-0,155)
Proximální část LF (g/cm ²)	0,115 (0,086-0,164)	0,102 (0,088-0,175)
Diafýza LF (g/cm ²)	0,079 (0,064-0,159)	0,078 (0,067-0,160)
Distální část LF (g/cm ²)	0,069 (0,039-0,153)	0,072 (0,048-0,136)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin+atorvastatin, potkani, kterým byla podávána kombinace amlodipinu a atorvastatin, každý v dávce 3 mg/kg/den.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Tabulka 29: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně femuru u potkanů kmene Wistar.

Mechanické vlastnosti kostní tkáně	aqua pro inj.	amlodipin+atorvastatin
Levý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-37)	37 (37-38)
Průměr femuru (mm)	3,55 (3,51-3,60)	3,52 (3,47-3,68)
Three-point bending (N)	174 (168-191)	176 (155-183)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (119-161)	143 (130-188)
Pravý femur		
Délka femuru (mm)	37 (36-38)	38 (38-39)*
Průměr femuru (mm)	3,38 (3,31-3,44)	3,48 (3,40-3,63)
Three-point bending (N)	192 (173-205)	187 (164-203)
Maximální tlaková síla krčku femuru (N)	145 (96-154)	145 (117-154)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=8.

aqua pro inj., kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin+atorvastatin, potkani, kterým byla podávána kombinace amlodipinu a atorvastatin, každý v dávce 3 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině aqua pro inj. (*p<0,05; p=0,04)

Obrázek 13: Vliv amlodipinu+atorvastatinu na hladinu BMP-2 v proximální části tibie u potkanů kmene Wistar.

kontrola, kontrolní skupina zvířat, kterým byla podávána *aqua pro injectione* 2 ml/kg BW/den; amlodipin+atorvastatin, potkani, kterým byla podávána kombinace amlodipinu a atorvastatin, každý v dávce 3 mg/kg/den.

BMP-2, kostní morfo-genetický protein 2

5 Diskuse

Příčiny špatného stravování a nesprávného životního stylu vedou ke vzniku tzv. civilizačních chorob, mezi které se řadí mimo jiné kardiovaskulární onemocnění (KVO) a též osteoporóza. Mezi hlavní rizikové faktory vzniku KVO patří vysoký krevní tlak a vysoká hladina cholesterolu. Osteoporóza a KVO se častěji vyskytují u starších lidí. V dnešní době, kdy na nás v průběhu života působí mnoho nepříznivých vlivů, je běžné, že lidé v pokročilém věku často užívají velké množství léků. U starších lidí se postupně rozvíjejí choroby, které musí být dlouhodobě či dokonce po zbytek pacientova života léčeny medikamentózně. Mezi tato onemocnění patří právě arteriální hypertenze, dyslipidémie a hypercholesterolémie, ale také např. *diabetes mellitus* 2. typu, psychiatrická onemocnění a mnoho dalších. S přibývajícím věkem dochází k úbytku kostní hmoty, čímž se zvyšuje riziko zlomenin, a proto je poslední dobou středem zájmu nových výzkumů, zda běžně předepisované léky nezasahují do kostního metabolismu. Pravděpodobně jak hypertenze, tak hypercholesterolémie negativně ovlivňují kostní metabolismus. Proto bylo pro moji práci důležité nejprve zjistit, zda samotný vybraný lék zasahuje do kostního metabolismu zdravého potkana a poté teprve stanovit, jaké má účinky u potkana s narušeným kostním metabolismem, kterého bylo docíleno provedením oboustranné orchidektomie.

5.1 Vliv orchidektomie u potkanů

Po provedené orchidektomii dochází k poklesu hladiny testosteronu v krvi. Hormony gonád jsou nepochybně velmi důležité pro správný růst a vývoj skeletu jak u žen, tak i u mužů. Testosteron se metabolizuje enzymem cytochrom-P450-aromatázou, který je přítomen v řadě tkání včetně kostní tkáně v buňkách osteoblastů, na 17 β -estradiol (Clarke a Khosla, 2009). Biologicky dostupný 17 β -estradiol je nezávislým prediktorem BMD u starších mužů a je zodpovědný za anabolický účinek androgenů. Estrogen samotný reguluje kostní resorpci, zatímco estrogen a testosteron společně, jsou důležité pro kostní novotvorbu u mužů (Růžičková, 2008).

Do 2. a 3. studie byly zařazeny dvě kontrolní skupiny - potkani po provedené orchidektomii a sham-operovaní potkani. Porovnáním získaných dat těchto skupin byl prokázán negativní vliv orchidektomie na hladinu kostních markerů, stavbu těla, BMD a mechanické vlastnosti kostí u potkanů kmene Wistar. Vlivem orchidektomie došlo po 12 týdnech k poklesu tělesné hmotnosti, k snížení svalové tkáně a k nárůstu tukové tkáně. Zjistili jsme signifikantně vyšší hladiny kostních markerů – CTX-I, BMP-2, BALP. Ostatní kostní markery (PINP, OPG) vykazovaly též zvýšení, ale bez statistické významnosti. Vzárust hodnot kostních markerů signalizuje zvýšení kostního obratu. V souladu s našimi výsledky byl popsán vliv ovariektomie u potkanů kmene Wistar na hladinu kostních markerů (Miyazaki *et al.*, 2004). Z dosavadních zjištění je zřejmé, že deficiencie gonadálních hormonů zapřičiňuje aktivaci jak osteoblastů, tak osteoklastů. Orchidektomie také způsobila signifikantní pokles BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a v oblasti femurů a s tím související zvýšení lomivosti, která byla prokázána pouze v oblasti diafýzy femuru. Tlaková odolnost krčku femuru zůstala nezměněna. Vlivem orchidektomie došlo k zpomalení růstu kostí. Femury byly znatelně kratší a jejich průměr a tloušťka kortikální části kosti signifikantně menší v porovnání s sham-operovanou skupinou. Tento vliv orchidektomie na kosti přikládáme snížené hladině růstového faktoru IGF-1, který pozitivně působí na růst kosti do délky i do šířky a zvyšuje utváření jak její části kortikální, tak trabekulární (Bonjour *et al.*, 2009). Již dříve provedené studie na potkanech ukazují, že deficiencie androgenů negativně ovlivňuje stavbu těla snížením celkové hmotnosti, tukuprosté tělesné hmoty, hustoty kostního minerálu a nárůstem tělesného tuku (Vanderschueren *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2010).

U spontánně hypertenzních potkanů způsobila provedená orchidektomie po 12 týdnech nárůst hladin markerů kostního obratu v proximální části tibie – PINP, CTX-I, BMP-2 a BALP, dále zapřičinila pokles růstového faktoru v séru IGF-1 a pokles BMD ve všech hodnocených oblastech skeletu a samotného femuru. Kastrace také ovlivnila množství tělesného tuku, který byl snížen v porovnání s sham-operovanými potkany.

Naše výsledky potvrzují zjištění z předchozích studií (Erben, 2001), že deficit androgenů u rostoucích potkanů negativně ovlivňuje vývoj kostí a že mladý potkan, který je ve vývinu a po provedené orchidektomii je vhodným modelem osteopenie.

Potkan po provedené orchidektomii je v současné době považován za vhodný zvířecí model pro studium mužského hypogonadismu, osteopenie a osteoporózy (Wink *et al.*, 1980; Verhas *et al.*, 1986; Erben, 2001; Ke *et al.*, 2001; Bagi *et al.*, 2011).

5.2 Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů

Prvním testovaným léčivem ze skupiny hypolipidemik byl zvolen ezetimib, selektivní inhibitor intestinální resorpce cholesterolu. Ezetimib patří mezi nová hypolipidemika a na počátku mého postgraduálního studia neexistovala zmínka o jeho vlivu na kostní metabolismus. Z těchto důvodů byl ezetimib vybrán pro experiment. Kladla jsem si otázku, jaký vliv má nové hypolipidemické léčivo na kostní tkáň, zda podporuje úbytek kostní tkáně či naopak může být dlouhodobě užíván, aniž by pacientovi hrozilo zvýšené nebezpečí fraktur. Vliv ezetimibu na kostní metabolismus byl zjišťován pouze u zdravých samců potkanů kmene Wistar, u kterých jsem mohla sledovat vliv samotného léku na jejich kostní metabolismus. Po osmi týdnech podávání ezetimibu v denní dávce 1 mg/kg BW nebyl prokázán statisticky významný účinek na koncentraci sérových markerů kostního obratu (PINP, CTX-I, OC, BALP), množství kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) v proximální části tibie, denzitu kostního minerálu v oblasti femuru, v oblasti bederních a ocasních obratlů a na mechanické vlastnosti kostní hmoty femuru. Naše výsledky jsou obdobné v porovnání s dosavadními studiemi u lidí (Kanazawa *et al.*, 2009; Sertbas *et al.*, 2010). Ezetimib neovlivnil kostní tkáň zdravého potkana, z tohoto důvodu již nebyl dále testován na potkanech s narušeným kostním metabolismem. Z dosavadních výsledků lze předpokládat, že ezetimib neovlivňuje kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar.

5.3 Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů

Další hypolipidemikum vybrané pro experimentální testování byl atorvastatin, inhibitor klíčového enzymu syntézy cholesterolu. O vlivu statinů na kostní metabolismus existuje mnoho studií, které ukazují z velké většiny pozitivní stránku

těchto léčiv na kostní metabolismus (Jadhav a Jain, 2006), ale ne všechny publikované práce se s tímto názorem ztotožňují (Maritz *et al.*, 2001). Toto byl impulz pro zvolení atorvastatinu k testování a objasnění jeho vlivu na kostní metabolismus u potkanů.

V první studii, která byla provedena u zdravých samců potkanů kmene Wistar, atorvastatin v denní dávce 3 mg/kg BW způsobil signifikantní pokles sérové hladiny BALP. Snížení bylo také prokázáno v kostním homogenátu z proximální části tibie, které ale nebylo statisticky významné v porovnání s kontrolou. Sérové hladiny ostatních stanovovaných markerů kostního obratu (PINP, CTX-I, OC) vykazovaly také snížení, ale bez požadované signifikance. Některé studie ukazují signifikantní snížení hladiny BALP po podání statinů (Rosenson *et al.*, 2005; Yavuz *et al.*, 2009; Rejnmark *et al.*, 2002; Hatzigeorgiou a Jackson, 2005). V randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studii byl prokázán signifikantní pokles hladiny BALP u pacientů, kterým byl podáván simvastatin v maximální denní dávce 80 mg/den po dobu 8 týdnů (Rosenson *et al.*, 2005). Ve studii publikované autory Yavuz *et al.* (2009), byl též prokázán po 8 týdnech statisticky významný pokles hladiny BALP po podání rosuvastatinu hypercholesterolemickým pacientům. V průřezové studii byl zjištěn pokles plazmatických hladin markerů kostního obratu – OC, BALP, CTX-I u 140 postmenopauzálních žen, které byly léčeny statiny déle než 2 roky (Rejnmark *et al.*, 2002). Meta-analýza publikována v roce 2005 (Hatzigeorgiou a Jackson) se zmiňuje o pozitivním vlivu statinů, které prokázaly signifikantní zlepšení rizika zlomenin krčku femuru a také malý, ale statisticky významný efekt na hladinu kostních markerů se snížením BALP a nárůstem NTX. Po 8 týdnech podávání atorvastatinu byl prokázán nárůst množství kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální části tibie u zdravých potkanů. Tento protein způsobuje zvýšení exprese a diferenciaci osteoblastů a následné zvýšení kostní novotvorby (Mundy *et al.*, 1999). Již dříve bylo prezentováno, že statiny vykazují stimulační účinek na osteoblasty, který je pravděpodobně způsoben indukcí BMP-2 (Mundy *et al.*, 1999; Jadhav a Jain, 2006). Kostní minerální hustota a mechanické vlastnosti femurů nebyli statisticky významně ovlivněny po osmi týdnech podávání atorvastatinu zdravým potkanům. Z výsledků prvního experimentu vyplývá, že atorvastatin zpomalil kostní obrat poklesem hladin kostních markerů a to především BALP, ale na druhé straně zvýšil množství BMP-2 v kostní tkáni. Domníváme se, že

zvýšení hladiny BMP-2 mohla být reakce na potlačení kostního novotvorby. Atorvastatin u zdravých samců potkanů ovlivnil pouze hladiny kostních markerů bez efektu na denzitu kostního minerálu a mechanické vlastnosti kostní tkáně.

Na základě výsledků z prvního experimentu jsme se rozhodli atorvastatin podávat v denní dávce 12 mg/kg BW po dobu 12 týdnů potkanům po provedené orchidektomii. Atorvastatin patří mezi nejčastěji předepisovaná léčiva ze skupiny statinů pacientům s hypercholesterolémií. Kardiovaskulární onemocnění spolu s osteoporózou se řadí mezi tzv. civilizační choroby s nejvyšším výskytem u osob v pokročilém věku. Když se zamyslíme nad tím, že tito pacienti pravidelně užívají velké množství léků, které mohou mít negativní dopad na kostní tkáň, tak nepochybně si často předepisovaný atorvastatin zaslouží pozornost ve výzkumu metabolismu kostí. Po 12 týdnech podávání hypolipidemika byl prokázán signifikantní pokles markerů kostního obratu – CTX-I, BMP-2 a OPG v porovnání s orchidektomovanou kontrolou. U pacientů s diagnózou *diabetes mellitus* 2. typu s mikroalbuminurií byl prokázán signifikantní pokles OPG po 18 týdnech podávání nízkých dávek (průměrná dávka 12,5 mg/den) simvastatinu (Nelleman *et al.*, 2007). Lze se domnívat, že pokles OPG u orchidektomovaných potkanů byl způsoben inhibicí osteoblastů atorvastatinem. V rozporu s naším zjištěním je studie Vierecka *et al.* (2005) na buněčných kulturách lidských osteoblastů, kdy atorvastatin zvýšil diferenciaci osteoblastů a expresi OPG. Dosavadní data a naše výsledky jen podporují hypotézu, že statiny odlišně působí v *in vitro* experimentech než v *in vivo*. Po 3 měsících léčby mužů s hypercholesterolémií atorvastatinem byl prokázán pokles markeru osteoresorpce NTX v séru (Majima *et al.*, 2007). V mnoha experimentech bylo prokázáno, že statiny zvyšují expresi genu pro BMP-2 (Jadhav a Jain, 2006). V prvním experimentu s atorvastatinem podávaným zdravým potkanům v denní dávce 3 mg/kg po dobu 8 týdnů, byl prokázán zvýšený nárůst BMP-2 v kostní tkáni. Naopak ve studii s orchidektomovanými potkany, kterým byl lék podáván ve vyšším množství 12 mg/kg a po delší dobu 12 týdnů, byl překvapivě prokázán signifikantní pokles BMP-2 v kosti. Rozdílný výsledek těchto dvou studií by mohl být zapříčiněn výchozím stavem skeletu potkana. Domníváme se, že vliv atorvastatinu na hladinu BMP-2 v kostní tkáni závisí na počátečním stavu kostního metabolismu, kdy v 1. experimentu byl nepoškozen a v 2. experimentu byl narušen

vlivem provedené orchidektomie. Po podávání atorvastatinu byla zjištěna vyšší hladina IGF-1 v séru v porovnání s orchidektomovanou kontrolou. IGF-1 je růstovým faktorem, který pozitivně působí na růst kosti do délky i do šířky a zvyšuje utváření jak její části kortikální, tak trabekulární. U potkanů, kterým byl podáván lék, došlo k růstu femuru jak do délky, tak do šířky a také se zvětšila tloušťka kortikalis v oblasti diafýzy v porovnání s kontrolou, u které došlo k zpomalení růstu kostí vlivem provedené orchidektomie. Orchidektomie také zapříčinila snížení sérové koncentrace IGF-1. Atorvastatin způsobil zvýšení syntézy IGF-1 a tím umožnil růst a vývoj kostí, který byl potlačen vlivem orchidektomie. Zlepšení celotělové kostní minerální hustoty je dalším pozitivním vlivem atorvastatinu na kostní tkáň. Výsledky BMD v hodnocených oblastech ukazují také zvýšení, ale bez statistické významnosti. Naše výsledky jsou v kontrastu s prací od Maritze *et al.* (2001), ve které se autoři zmiňují o negativním vlivu atorvastatinu (2,5 mg/kg/den) na BMD femuru u intaktních samic potkanů Sprague-Dawley po 12 týdnech podávání. Po podávání atorvastatinu v našem experimentu došlo také k zvýšení pevnosti diafýzy femuru. Statistická významnost byla prokázána pouze u levého femuru, ale výsledky pravého femuru vykazují též zvýšení hodnot maximální tlakové síly. Uyar *et al.* (2009) také prokázali zlepšení pevnosti diafýzy femuru u kastrovaných samic potkanů Sprague-Dawley po 8 týdnech podávání atorvastatinu (50 mg/kg/den) v porovnání s kastrovanou kontrolou. Navíc také zjistili nárůst BMD femuru.

5.4 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů

Po 8 týdnech podávání amlodipinu v denní dávce 3 mg/kg BW zdravým samcům potkanů kmene Wistar byl pozorován statisticky významný pokles sérové koncentrace markeru kostní resorpce CTX-I. Dále došlo k signifikantnímu poklesu hladiny markeru kostní novotvorby BALP a to jak v séru, tak v kostní tkáni. Pokles sérové koncentrace PINP byl sice patrný, nedosáhl však statistického významu ($p=0,06$). Naše výsledky naznačují, že vlivem amlodipinu dochází k potlačení kostního obratu u zdravých potkanů kmene Wistar. Po 8 týdnech podávání léku došlo k zvýšené expresi BMP-2 v proximální části tibie. Domníváme se, že zvýšená hladina proteinu BMP-2 je

pravděpodobně kompenzační reakcí na potlačení funkce osteoblastů amlodipinem. Tento předpoklad však vyžaduje další studie. Vyhodnocením BMD a mechanických vlastností kostní tkáně jsme nezjistili signifikantní změny. U pravého femuru bylo pozorováno zvětšení průměru femuru ve středu diafýzy, ale výsledky levých femurů zvětšení nepotvrdily. Naše výsledky naznačují, že užívání amlodipinu v podávané dávce může způsobovat zpomalení kostního metabolismu bez signifikantního zásahu do BMD a mechanických vlastností kostní tkáně zdravých samců potkanů kmene Wistar.

V 2. studii byl orchidektomovaným potkanům kmene Wistar podáván amlodipin v denní dávce 3 mg/kg BW. Po 12 týdnech podávání antihypertenziva potkanům došlo k statisticky významnému poklesu markerů kostního obratu PINP, CTX-I, BALP, BMP-2 a OPG a k signifikantnímu nárůstu IGF-1 v porovnání s kontrolními potkany po orchidektomii. Naše výsledky jsou obdobné s prací Ushijima *et al.* (2010), kteří samcům SHRSP podávali amlodipin v dávce 3 mg/kg BW po dobu 3 měsíců a prokázali statisticky významný pokles sérové hladiny CTX-I. Práce Ritchie *et al.* (1994) uvádí, že dihydropyridiny pravděpodobně potlačují kostní resorpci přímou inhibicí funkce osteoklastů. Naše výsledky potvrzují, že amlodipin inhibuje funkci osteoklastů snížením hladiny CTX-I *in situ* v tibii. Po 12 týdnech podávání amlodipinu došlo k signifikantnímu poklesu hladiny BALP. Podobné výsledky se vyskytly i v práci Moreas *et al.* (2010), kdy po 1, 7 a 14 dnech podávání amlodipinu prokázali pokles sérové alkalické fosfatázy u samců potkanů kmene Wistar. Naše výsledky ukazují pozitivní vliv amlodipinu zvýšením hladiny IGF-1, která byla vlivem orchidektomie snížena. Halici *et al.* (2008) zjistili u kastrovaných samic potkanů kmene Wistar, kterým byl podáván amlodipin v dávce 1 a 3 mg/kg BW po dobu 8 týdnů, signifikantní nárůst koncentrace kalcia a fosforu ve stehenní kosti pomocí rentgenové fluorescenční spektrometrie. V naší práci jsme neprokázali zvýšení množství kalcia v tibii po podávání amlodipinu orchidektomovaným potkanům. Naše výsledky naznačují, že amlodipin významně zasahuje do kostního metabolismu potkanů, má pozitivní vliv na kostní metabolismus snížením kostního obratu, který byl vystupňován vlivem orchidektomie. U potkanů, kterým byl podáván amlodipin, došlo k nárůstu celotělové BMD. V hodnocených oblastech skeletu se nám nepodařilo prokázat signifikantní nárůst BMD v porovnání s orchidektomovanou kontrolou na rozdíl od Ushijima *et al.* (2010), kteří prokázali

statisticky významný nárůst BMD femuru po 3 měsících podávání amlodipinu. Tlaková síla nutná ke zlomení levého femuru v oblasti diafýzy statisticky významně vzrostla, což dokazují i hodnoty průměru femuru v oblasti zlomu a tloušťky kortikální části kosti. U pravého femuru jsme nepotvrdili statisticky významný nárůst tlakové síly v oblasti diafýzy, ale přesto získané hodnoty naznačují zlepšení mechanické odolnosti kostní tkáně. Vysvětlení pro tuto stranovou diferenci prozatím chybí. Výsledky z 2. experimentu naznačují, že dlouhodobé podávání amlodipinu potkanům kmene Wistar po orchidektomii má pozitivní vliv na kostní metabolismus snížením kostního obratu. Po 12 týdnech podávání antihypertenziva došlo k nárůstu hustoty kostního minerálu a k zlepšení vlastností mechanické odolnosti kostní tkáně. Lze předpokládat, že podávání amlodipinu pacientům s diagnostikovanou osteoporózou, by mohl mít protektivní účinek na kostní tkáň.

Amlodipin podávaný v dávce 2,5 mg/kg BW kostrovaným spontánně hypertenzním potkanům způsobil signifikantní pokles markerů kostního obratu CTX-I a BMP-2 a k statisticky nevýznamnému snížení BALP a nárůstu IGF-1. Došlo tedy k zpomalení kostního obratu inhibicí jak osteoblastů, tak osteoklastů. Na BMD a mechanické vlastnosti kostní tkáně nebyl pozorován signifikantní efekt.

Ve všech třech studiích byl pozorován významný vliv na hladiny markerů kostního obratu. Amlodipin způsobil zpomalení kostního obratu ovlivněním jak osteoklastů, tak osteoblastů. Rozdílný efekt byl pozorován na hladinu růstového faktoru osteoblastů BMP-2 v kosti, kdy u zdravých potkanů došlo k zvýšení jeho hladiny a u potkanů po orchidektomii bylo tomu naopak. Předpokládáme, že vliv antihypertenziva na hladinu BMP-2 závisí na délce podávání a na výchozím stavu kostního metabolismu potkanů.

5.1 Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů

Kombinační léčba pacientů s rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění představuje moderní směr v terapii hypertenze a poruch lipidového metabolismu. Na našem trhu je k dispozici fixní kombinace právě námi vybraných léčiv -

antihypertenziva amlodipinu a hypolipidemika atorvastatinu v jedné tabletě (10mg/10mg) pod názvem Caduet od firmy Pfizer. Přípravek Caduet je indikován pro prevenci kardiovaskulárních příhod u pacientů s hypertenzí, u nichž se současně vyskytují tři kardiovaskulární rizikové faktory a kteří mají normální nebo mírně zvýšenou hladinu cholesterolu v plazmě, nemají klinické příznaky ischemické choroby srdeční a u nichž se považuje za vhodné podávání kombinace amlodipinu spolu s nízkými dávkami atorvastatinu v souladu se současnými doporučeními pro léčbu (terapeutické indikace ze Souhrnu údajů o přípravku, Příloha č. 2 k rozhodnutí o změně registrace sp. zn. sukls171154/2009).

Z důvodu výskytu fixní kombinace těchto léčiv na českém trhu jsme se rozhodli podávat kombinaci amlodipin (3 mg/kg BW) a atorvastatin (3 mg/kg BW) samcům potkanům kmene Wistar s nenarušeným kostním metabolismem po dobu 8 týdnů. V krevním séru byl zjištěn signifikantní pokles koncentrace BALP na 34 % v porovnání s kontrolou. Pokud bychom chtěli hodnotit účinnost léků samotných, tak po podávání amlodipinu došlo k poklesu až na 12 % a po podání atorvastatinu na 30 % v porovnání s kontrolní skupinou. Z výsledků je patrné, že podávání kombinace léčiv je méně účinná na hladinu BALP v séru, než podávání samotných léčiv a to především amlodipinu. Jak po podání léčiv samotných, tak v kombinaci došlo k nárůstu koncentrace BMP-2 v proximální části tibie. Z výsledků je zřejmé, že po podávání samotného atorvastatinu vzrostla hladina BMP-2 nejvíce a po podávání samotného amlodipinu nejméně. Po 8 týdnech podávání kombinace léčiv jsme zjistili u pravého femuru jeho signifikantní nárůst do délky v porovnání s kontrolou. Levé femury vykazovaly též větší délku v porovnání s kontrolní skupinou, ale bez požadované signifikance.

5.2 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů

V současnosti máme k dispozici několik studií o vlivu β -blokátorů na kostní metabolismus a převážná většina z nich demonstrovuje pozitivní vliv na skelet. Bylo zjištěno, že β -blokátory pravděpodobně zvyšují novotvorbu kostní hmoty (Takeda *et al.*, 2002). Mnohé práce uvádí, že užívání β -blokátorů zlepšuje kostní minerální hustotu (Pasco *et al.*, 2004; Turker *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011) a snižuje

riziko fraktur (Pasco *et al.*, 2004; Schlienger *et al.*, 2004; Rejnmark *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007; Meisinger *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Naopak Rejnmark *et al.* (2004) ve své práci uvádí, že perimenopauzální ženy léčené β -blokátory (též metoprololem) měly trojnásobné riziko vzniku fraktury a o 20 % nižší sérový osteokalcin v porovnání s neléčenými ženami.

Beta-blokátory patří mezi často užívanou skupinu antihypertenziv, mezi které patří také právě metoprolol. O jeho vlivu na kostní metabolismus se zatím mnoho neví a dosavadní data o β -blokátorech a jejich vlivu na kostní metabolismus jsou nejednotná.

V 1. experimentu byli použiti zdraví dospělí samci potkanů kmene Wistar, jejichž kostní metabolismus byl ovlivněn pouze β -blokátorem v relativně nízké denní dávce 5 mg/kg BW a v relativně krátkém čase 8 týdnů – v porovnání s lidmi, kteří tyto léky užívají dlouhodobě a na jejich kostní metabolismus navíc působí faktory jak neovlivnitelné (vnitřní, endogenní; např. věk, rasa, pohlaví, genetické vliv, geografické a klimatické vlivy), tak ovlivnitelné (vnější, exogenní; např. životní styl, užívání některých léků). Stanovovali jsme hustotu kostního minerálu ve 3 oblastech skeletu s rozdílným zastoupením trabekulární a kortikální kosti a neprokázali jsme statisticky významnou změnu po 8 týdnech podávání metoprololu. Ačkoli nedošlo ke změně v BMD, prokázali jsme statisticky významný pokles tlakové odolnosti krčku nutné ke zlomení pouze u pravého femuru v porovnání s kontrolní skupinou. U levého femuru byl patrný také pokles, ale bez požadované signifikance. Pomocí three-point bending testu nebyla zjištěna statistická významnost v maximální tlakové síle ve střední oblasti diafýzy mezi skupinami. Naše výsledky naznačují, že metoprolol ovlivňuje kostní tkáň a to především trabekulární část kosti, která je metabolicky aktivnější než kost kortikální. Lokálně v kosti došlo k zdatelnému nárůstu exprese kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální části tibie. Domníváme se, že zvýšení syntézy BMP-2 je reakcí na změnu (zeslabení) trabekulární části kosti vlivem metoprololu.

V naší 2. studii jsme sledovali vliv metoprololu u samců potkanů kmene Wistar na kostní metabolismus, který byl narušen vlivem orchidektomie. Lék byl podáván po relativně dlouhou dobu 12 týdnů v denní dávce 54 mg/kg BW. Po 12 týdnech podávání metoprololu orchidektomovaným potkanům bylo prokázáno snížení kostního obratu.

Došlo k signifikantnímu poklesu hladin CTX-I, PINP, BMP-2 a OPG. Kostní alkalická fosfatáza také poklesla, ale bez statistické významnosti. Je zajímavé, že v předchozím experimentu na zdravých dospělých samcích potkanů kmene Wistar, kterým byl podáván metoprolol v nižší dávce (5 mg/kg BW) a po kratší dobu (8 týdnů), došlo k zvýšení množství růstového faktoru osteoblastů BMP-2 v proximální části tibie. Kostní morfogenetické proteiny (BMP) patří do nadrodiny růstových faktorů TGF- β (Transforming Growth Factor β), které podporují diferenciaci mezenchymálních buněk v chondrocyty a osteoblasty a osteoprogenitorových buněk v osteoblasty (Lieberman *et al.*, 2002). Naopak u orchidektomovaných potkanů se hladina BMP-2 v kostním homogenátu po podávání metoprololu signifikantně snížila. Potkani s neporušeným kostním metabolismem reagovali na podání metoprololu v předchozím experimentu odlišnou expresí BMP-2 v kostní tkáni než potkani, kteří měli kostní metabolismus narušen vlivem orchidektomie. Naše výsledky ukazují pozitivní vliv metoprololu zvýšením hladiny IGF-1, která byla vlivem orchidektomie snížena. V naší předchozí studii metoprolol způsobil snížení tlakové odolnosti krčku femuru po 8 týdnech podávání. V této studii metoprolol neovlivnil ani kostní minerální hustotu a ani mechanické vlastnosti kostí u orchidektomovaných potkanů. Naše výsledky bohužel nepodpořily hypotézu většiny prací, že beta-blokátory zlepšují BMD a snižují riziko vzniku fraktur.

Ve třetí studii se spontánně hypertenzními potkany, kterým byl podáván metoprolol v denní dávce 50 mg/kg BW po dobu 12 týdnů, se projevil vliv léčiva pouze na hladinu kostních markerů. Byl prokázán signifikantní pokles PINP a nesignifikantní pokles CTX-I, BMP-2 a BALP v porovnání s orchidektomovanou kontrolní skupinou.

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

6 Závěry

Disertační práce shrnuje dosavadní poznatky o vlivu vybraných hypolipidemik (ezetimib, atorvastatin) a antihypertenziv (amlodipin, metoprolol) na kostní metabolismus. Dále hodnotí a diskutuje nová zjištění o účincích těchto léčiv na kostní metabolismus u zdravých nebo kastrovaných samců potkanů kmene Wistar, a také u spontánně hypertenzních potkanů, kterým byla provedena oboustranná orchidektomie. Předkládaná práce byla soustředěna na hodnocení změn koncentrací kostních markerů nejen v séru, ale také v kostní tkáni. Též byla zaměřena na zjišťování změn v denzitě kostního minerálu v různých oblastech skeletu a na změnu tělesné stavby (tukové a svalové tkáně). V neposlední řadě bylo středem zájmu zjištění změn mechanických vlastností femuru.

Ze získaných výsledků lze shrnout tyto závěry:

- **Orchidektomie** provedená u potkanů kmene Wistar způsobila po 12 týdnech zvýšení kostního obratu (nárůst koncentrací kostních markerů – PINP, CTX-I, BALP, OPG, BMP-2), pokles sérové koncentrace růstového faktoru IGF-1, snížení BMD a zpomalení vývoje kostní hmoty, která vyústila ve zvýšenou lomivost v porovnání s intaktními potkany. Potvrdili jsme negativní vliv kastrace na stavbu těla a na kostní metabolismus.
- **Ezetimib** v denní dávce 1 mg/kg BW signifikantně neovlivnil kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar po osmi týdnech podávání. Léčivo pravděpodobně neovlivňuje kostní metabolismus alespoň u potkanů a lze ho podávat bez obav z narušení skeletu.
- **Atorvastatin** podávaný po dobu osmi týdnů v denní dávce 3 mg/kg BW zdravým samcům potkanů kmene Wistar prokázal pozitivní vliv na kostní metabolismus snížením kostního metabolického obratu (statisticky významný pokles sérové koncentrace BALP) a zvýšenou syntézou BMP-2 v proximální části tibie v porovnání s kontrolními potkany. Atorvastatin (12 mg/kg BW) podávaný orchidektomovaným potkanům kmene Wistar

- způsobil po 12 týdnech pokles kostního obratu (signifikantní pokles CTX-I, BMP-2, OPG), zvýšení syntézy IGF-1 a zlepšení mechanických vlastností femuru. V porovnání s kontrolními potkany po orchidektomii byly femury delší, v průměru silnější a zvýšila se maximální tlaková síla nutná ke zlomení ve středu diafýzy femuru. Atorvastatin je vhodným hypolipidemikem u pacientů s narušeným kostním metabolismem. Mohlo by se uvažovat o jeho podávání pro prevenci vzniku osteoporózy.
- **Amlodipin** (3 mg/kg BW) podávaný 8 týdnů zdravým potkanům snížil kostní obrat (signifikantní pokles CTX-I, BALP v séru i v kostním homogenátu) a zvýšil syntézu BMP-2 v kosti. Toto antihypertenzivum podávané ve stejné dávce jako v prvním experimentu po dobu 12 týdnů orchidektomovaným potkanům kmene Wistar snížilo kostní metabolický obrat (signifikantní pokles všech stanovovaných kostních markerů), způsobilo nárůst IGF-1, zvýšení celotělové BMD a pokles lomivosti diafýzy femuru v porovnání s kontrolou po orchidektomii. U orchidektomovaných potkanů kmene SHR byl prokázán snížený kostní metabolický obrat signifikantním poklesem ukazatele kostní resorpce CTX-I a růstového faktoru osteoblastů BMP-2. Z výsledků vyplývá, že amlodipin působí pozitivně na kostní metabolismus alespoň u samců potkanů.
 - **Kombinace amlodipin+atorvastatin** způsobila pokles sérové koncentrace BALP a nárůst BMP-2 v kostní tkáni. Dále signifikantní růst femuru do délky, který byl prokázán pouze u pravého femuru, u levého byl též patrný, ale bez požadované signifikance. Tato kombinace léčiv se jeví pozitivními účinky na kostní metabolismus, stejně jako léčiva podávaná samotná.
 - **Metoprolol** (5 mg/kg BW) způsobil po 8 týdnech sice nárůst množství BMP-2 v proximální části tibie, ale pokles maximální tlakové odolnosti krčku ke zlomení pouze u pravého femuru v porovnání s kontrolou. U orchidektomovaných potkanů kmene Wistar došlo po 12 týdnech podávání metoprololu (54 mg/kg BW) k poklesu kostního metabolického

obratu (signifikantní pokles PINP, CTX-I, BMP-2, OPG) a nárůstu sérové koncentrace IGF-1 v porovnání s orchidektomovanou kontrolou. U orchidektomovaných potkanů kmene SHR jsme prokázali statisticky významný pokles PINP. Výsledky jsou dosti nejednoznačné. Lze předpokládat, že u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar a spontánně hypertenzních potkanů má metoprolol pozitivní vliv na kostní metabolismus jeho zpomalením, ale bez významného vlivu na BMD a síly nutné ke zlomení diafýzy a krčku femuru. Vzhledem k nejednotnosti výsledků nelze s jistotou tvrdit, zda má metoprolol spíše negativní nebo pozitivní účinky.

Závěrem lze říci, že vybraná léčiva (atorvastatin, amlodipin, metoprolol) ovlivňují určitým způsobem kostní metabolismus a to jak u zdravých samců potkanů, tak i u potkanů s narušeným kostním metabolismem navozeným kastrací. Z výsledků předkládané disertační práce vyplývá, že se účinky léčiv v některých hodnocených parametrech významně liší u zdravého a orchidektomovaného potkana. Vliv léčiv na skelet evidentně závisí na výchozím stavu kostního metabolismu potkana.

Prezentovaná práce přináší nové poznatky o vlivu vybraných hypolipidemik a antihypertenziv na kostní metabolismus a zároveň otvírá další témata pro budoucí studium této problematiky za použití modernější přístrojové techniky a molekulárně-biologických metod. Předkládaná disertační práce nastínila problém, který upozorňuje na to, že výběr vhodného antihypertenziva a hypolipidemika by měl zohlednit i současný stav kostního metabolismu u pacienta. Vzhledem k tomu, že právě tato léčiva jsou běžně předepisována lidem v pokročilém věku, kteří mají velmi často diagnostikovanou osteopenii či osteoporózu.

7 Souhrn

Osteoporóza patří mezi nejčastější metabolická kostní onemocnění, které se řadí mezi závažné civilizační choroby a představuje velký zdravotní a socioekonomický problém zvláště ve vyšších věkových kategoriích. Kardiovaskulární onemocnění jsou jedním z velkých problémů naší společnosti a nejčastější příčinou úmrtnosti na celém světě. Mezi hlavní rizikové faktory patří hypercholesterolémie a arteriální hypertenze, které jsme schopni účinně ovlivnit řadou léků. Prozatím nebyla věnována velká pozornost skutečnosti, zda a jak tyto léky ovlivňují kostní metabolismus. S přibývajícím věkem lidí se častěji vyskytuje hypertenze a hypercholesterolémie společně s progredujícím úbytkem kostní hmoty vedoucí až k osteoporóze. Mnohé studie naznačují, že antihypertenziva a hypolipidemika určitým způsobem zasahují i do kostního metabolismu.

Předmětem zájmu předkládané práce bylo zkoumání vlivu vybraných, často předepisovaných, léčiv ze skupiny antihypertenziv (amlodipin, metoprolol) a hypolipidemik (ezetimib, atorvastatin) na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar a u potkanů po provedené orchidektomii (Wistar a spontánně hypertenzních potkanů).

Během mého doktorského studia byly provedeny tři experimenty na potkanech se zmiňovanými léčivy. V 1. experimentu byla podávána léčiva (metoprolol, amlodipin, atorvastatin, ezetimib, kombinace amlodipin+atorvastatin) samcům potkanům kmene Wistar s kostním metabolismem nenarušeným kastrací. V 2. studii byla podávána léčiva (amlodipin, metoprolol, atorvastatin) orchidektomovaným potkanům kmene Wistar a ve 3. experimentu pouze antihypertenziva (amlodipin, metoprolol) orchidektomovaným spontánně hypertenzním potkanům.

Ezetimib nevykazoval signifikantní efekt na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů. Ostatní léčiva způsobila utlumení kostního metabolického obratu a zvýšenou syntézu růstového faktoru osteoblastů BMP-2 v kostní tkáni. Po podávání metoprololu došlo k zvýšené lomivosti krčku pravého femuru. Výsledky z levého femuru nebyly signifikantní, ale vykazovaly také snížení maximální tlakové síly nutné ke zlomení.

Orchidektomie navodila zrychlení kostního metabolického obratu, který byl zjištěn nárůstem koncentrací kostních markerů, dále pokles IGF-1, kostní minerální hustoty a zvýšenou lomivost femurů. Po 12 týdnech podání léčiv orchidektomovaným potkanům kmene Wistar bylo prokázáno utlumení kostního obratu poklesem kostních markerů a nárůstem IGF-1. Nejúčinněji se jevil atorvastatin, který navíc způsobil zvýšení hustoty kostního minerálu, nárůst femurů v průměru a délce a s tím související lepší pevnost kostní tkáně v porovnání s orchidektomovanou kontrolou. Dále pak amlodipin, který zlepšil celotělovou hustotu kostního minerálu a parametry levého femuru (průměr, tloušťka kortikální části kosti a síla nutná ke zlomení v oblasti diafýzy femuru), u pravého femuru jevíly hodnoty stejnou tendenci, ale nesignifikantně.

Ve 3. experimentu byla podávána antihypertenziva po dobu 12 týdnů orchidektomovaným spontánně hypertenzním potkanům. Amlodipin a metoprolol způsobily utlumení kostního metabolického obratu, který byl zvýšen vlivem orchidektomie. Na hustotu kostního minerálu a mechanické vlastnosti kostní tkáně neměla antihypertenziva statisticky významný vliv.

Získaná data umožnila demonstrovat vliv vybraných léčiv na kostní metabolismus. Selektivní inhibitor absorpce cholesterolu ezetimib neměl vliv na kostní metabolismus potkana. Atorvastatin, inhibitor biosyntézy cholesterolu, ukázal nejvíce pozitivní účinek na kostní tkáň. Statiny vykazují mnoho pleiotropních účinků, mezi které patří také vliv na kostní metabolismus, který byl v předkládané práci prokázán. Lze předpokládat, že atorvastatin má velmi pozitivní vliv na skelet, alespoň u potkanů. Dalším léčivem, které se jeví jako prospěšné na kostní metabolismus, je blokátor kalciových kanálů amlodipin. Metoprolol ze skupiny β -blokátorů vykazuje rozporuplný vliv na kostní tkáň a to především na odolnost krčku femuru v tlaku nutného ke zlomení u zdravých samců potkanů, ale u orchidektomovaných potkanů tento negativní vliv nebyl prokázán.

Lze předpokládat, že statiny a deriváty dihydropyridinu by mohly oddálit projevy vzniku osteoporózy alespoň u potkanů. Je nutné provést další experimenty za použití modernější přístrojové techniky a molekulárně-biologických metod. Dále je také nutné potvrdit účinek na skelet v retrospektivních či prospektivních studiích u pacientů užívajících tato léčiva.

8 Summary

Osteoporosis is one of the most common metabolic bone diseases, which belong to civilization diseases, and is a major health and socioeconomic problem, particularly in the older age groups. Cardiovascular diseases are one of the great problems of our society and a leading cause of death worldwide. The major risk factors include hypercholesterolemia and arterial hypertension, which can be effectively reduced by several groups of drugs. At the present, not much attention has been paid to whether or how these drugs affect bone metabolism. With increasing age, people are more likely to develop hypertension and hypercholesterolemia with progressive loss of bone leading to osteoporosis. Many studies have suggested that antihypertensive and hypolipidemic drugs in some way influence bone metabolism.

The subject of the present thesis was to investigate the effect of selected, frequently prescribed antihypertensive drugs (amlodipine, metoprolol), and hypolipidemic drugs (ezetimibe, atorvastatin) on bone metabolism in healthy male Wistar albino rats and in rats after orchidectomy (Wistar and spontaneously hypertensive rats).

During my postgradual study, three experiments in rats with above mentioned drugs were performed. In the first experiment, drugs (metoprolol, amlodipine, atorvastatin, ezetimibe, a combination of amlodipine + atorvastatin) were administered to male albino Wistar rats with bone metabolism undisturbed castration. In the second study, drugs (amlodipine, metoprolol, atorvastatin) were administered to orchidectomized Wistar rats. In the third experiment, orchidectomized spontaneously hypertensive rats were treated with antihypertensive drugs (amlodipine, metoprolol).

Ezetimibe did not show any significant effect on bone metabolism in healthy male rats. Other drugs caused suppression of bone turnover and increased synthesis of osteoblast growth factor BMP-2 in bone tissue. After administration of metoprolol, maximum strength of the right femoral neck was increased. Results from the left femur were not significant, but showed a reduction of the femoral neck maximum load.

Orchidectomy induced acceleration of bone turnover as indicated by increased concentrations of bone markers, reduction of IGF-I, bone mineral density and increased fragility of the femur. Suppression of bone turnover by decrease in bone markers and increase in IGF-I were shown after 12 weeks administration of drugs to orchidectomized Wistar rats. The most effective agent seems to be atorvastatin, which increased bone mineral density, diameter and length of the femurs, and thus improved bone strength compared with orchidectomized control rats. Furthermore, amlodipine improved whole-body bone mineral density and parameters of the left femur (diameter, thickness of cortical bone and the maximal strength of the femoral shaft). In the right femur, the values had the same tendency, but were not significantly changed.

In the third experiment, antihypertensive drugs were given to orchidectomized spontaneously hypertensive rats for 12 weeks. Amlodipine and metoprolol caused a suppression of bone turnover, which had been increased by the influence of orchidectomy. The antihypertensive drugs did not have statistically significant effects on the bone mineral density and mechanical properties of bone tissue.

Obtained data allowed demonstrating the effect of selected drugs on bone metabolism. Ezetimibe, a selective cholesterol absorption inhibitor, had no effect on bone metabolism in rats. Atorvastatin, an inhibitor of cholesterol synthesis, showed the most positive effect on bone tissue. Statins exhibit many pleiotropic effects, which include also effect on bone metabolism, which was demonstrated in the presented work. It can be assumed that atorvastatin has a very positive effect on the skeleton, at least in rats. Another drug that appears to be beneficial on bone metabolism is the calcium channel blocker amlodipine. β -blocker metoprolol has inconsistent effects on bone tissue, especially in the compression test of the femoral neck. The maximal load was decreased in healthy male Wistar rats, but in orchidectomized rats this negative effect was not demonstrated.

It can be assumed that the dihydropyridine derivatives and statins could delay the symptoms of osteoporosis, at least in rats. It is necessary to perform further experiments using more modern instrumentation and molecular biology methods. It is also necessary to confirm the effect on the skeleton in retrospective or prospective studies in patients taking these drugs.

9 Použitá literatura

- 1) ADAM, Zdeněk – ŠEVČÍK, Pavel – VORLÍČEK, Jiří – MISTRÍK, Martin a kol. *Kostní nádorová choroba*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2005. 296 s. ISBN 80-247-1357-8. Kapitola 1.1.6, Nejvýznamnější regulační mechanismus – osteoprotegerin – RANKL, s. 25-26.
- 2) ALEXANDRE, C. Androgens and bone metabolism. *Joint Bone Spine*, 2005, vol. 72, no. 3, s. 202-206.
- 3) ALMEIDA, S.A. – TEÓFILO, J.M. - ANSELMO FRANCI, J.A. – BRENTGANI, L.G. - LAMANO-CARVALHO, T.L. Antireproductive effect of the calcium channel blocker amlodipine in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2000, vol. 52, no. 4, s. 353-356.
- 4) ALTMANN, S.W. – DAVIS, H.R. JR – ZHU, L.J. – YAO, X. – HOOS, L.M. – TETZLOFF, G. – IYER, S.P. – MAGUIRE, M. – GOLOVKO, A. – ZENG, M. – WANG, L. – MURGOLO, N. – GRAZIANO, M.P. Niemann – Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5661, s. 1201-1204.
- 5) BAGI, C.M. – BERRYMAN, E. – MOALLI, M.R. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comparative Medicine*, 2011, vol. 61, no. 1, s. 76-85.
- 6) BONJOUR, J.P. – CHEVALLEY, T. – FERRARI, S. – RIZZOLI, R. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Pública de México*, 2009, vol. 51, suppl. 1, s. 5-17.
- 7) BONNET, N. – GADOIS, C. – MCCLOSKEY, E. – LEMINEUR, G. – LESPESSAILLES, E. – COURTEIX, D. – BENHAMOU, C.L. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone*, 2007, vol. 40, no. 5, s. 1209-1216.
- 8) BONNET, N. – PIERROZ, D.D. – FERRARI S.L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2008, vol. 8, no. 2, s. 94-104.
- 9) BROULÍK, P.D. – BROULÍKOVÁ, K. Raloxifen prevents bone loss in castrated male mice. *Physiological Research*, 2007, vol. 56, no. 4, s. 443-447.

- 10) BROULÍK, Petr. *Osteoporóza : osteoporóza, osteomalacie, osteodystrofie*. Praha : Maxdorf, 1999. 172 s. ISBN 80-85800-93-4. Kapitola 1.1, Kolagen, s. 10-13.
- 11) BROULÍK, Petr. *Osteoporóza a její léčba*. Praha : Maxdorf, 2007. 135 s. ISBN 978-80-7345-134-9. Kapitola 1., Úvod, s. 11.
- 12) BROWN, J.P. – ALBERT, C. – NASSAR, B.A. – ADACHI, J.D. – COLE, D. – DAVISON, K.S. – DOOLEY, K.C. – DON-WAUCHOPE, A. – DOUVILLE, P. – HANLEY, D.A. – JAMAL, S.A. – JOSSE, R. – KAISER, S. – KRAHN, J. – KRAUSE, R. – KREMER, R. – LEPAGE, R. – LETENDRE, E. – MORIN, S. – OOI, D.S. – PAPAIOANNOU, A. – STE-MARIE, L.G. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clinical Biochemistry*, 2009, vol. 42, no. 10-11, s. 929-942.
- 13) BULTAS, J. Ezetimib - selektivní inhibitor absorpce cholesterolu. *Remedia*, 2004, roč. 14, č. 2, s. 214-216.
- 14) CALLEWAERT, F. – BOONEN, S. – VANDERSCHUEREN, D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2010, vol. 21, no. 2, s. 89-95.
- 15) CAPPuccio, F.P. – MEILAHN, E. – ZMUDA, J.M. – CAULEY, J.A. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*, 1999, vol. 354, no. 9183, s. 971-975.
- 16) CIVANTOS, B. – ALEIXANDRE, A. Blood pressure and alpha-vascular reactivity in hypertensive rats treated with amlodipine and dietary Ca. *European Journal of Pharmacology*, 2004, vol. 489, no. 1-2, s. 101-110.
- 17) CLARKE, B.L. – KHOSLA, S. Androgens and bone. *Steroids*, 2009, vol. 74, no. 3, s. 296-305.
- 18) COXON, F.P. – ROGERS, M.J. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcified Tissue International*, 2003, vol. 72, no. 1, s. 80-84.
- 19) DE VILLIERS, T.J. Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2009, vol. 23, no. 1, s. 73-85.

- 20) DEVABHAKTUNI, M. – BANGALORE, S. Fixed combination of amlodipine and atorvastatin in cardiovascular risk management: patient perspectives. *Vascular Health and Risk Management*, 2009, vol. 5, no. 1, s. 377-387.
- 21) DUNCAN, R.L. – AKANBI, K.A. – FARACH-CARSON, M.C. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Seminars in Nephrology*, 1998, vol. 18, no. 2, s. 178-190.
- 22) ERBEN R.G. Skeletal effects of androgen withdrawal. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2001, vol. 1, no. 3, s. 225-233.
- 23) ERNST, M. – RODAN, G.A. Estradiol regulation of insulin-like growth factor-I expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Molecular Endocrinology*, 1991, vol. 5, no. 8, s. 1081-1089.
- 24) European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease, National Osteoporosis Foundation, and National Institute of Arthritis, Musculoskeletal, and Skin Diseases, "Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis," *American Journal of Medicine*, 1993, vol. 94, no. 6, s. 646-650.
- 25) GARNERO, P. – VERGNAUD, P. – HOYLE, N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clinical Chemistry*, 2008, vol. 54, no. 1, s. 188-196.
- 26) GENTILE, M.A. – NANTERMET, P.V. – VOGEL, R.L. – PHILLIPS, R. – HOLDER, D. – HODOR, P. – CHENG, C. – DAI, H. – FREEDMAN, L.P. – RAY, W.J. Androgen-mediated improvement of body composition and muscle function involves a novel early transcriptional program including IGF1, mechano growth factor, and induction of {beta}-catenin. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2010, vol. 44, no. 1, s. 55-73.
- 27) GOTOH, M. – MIZUNO, K. – ONO, Y. – TAKAHASHI, M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertension Research*, 2005, vol. 28, no. 7, s. 565-570.

- 28) GU, Y. – PRESTON, M.R. – MAGNAY, J. – EL HAJ, A.J. – PUBLICOVER, S.J. Hormonally-regulated expression of voltage-operated Ca(2+) channels in osteocytic (MLO-Y4) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, vol. 282, no. 2, s. 536-542.
- 29) HALICI, Z. – BOREKCI, B. – OZDEMIR, Y. – CADIRCI, E. – SULEYMAN. H. Protective effects of amlodipine and lacidipine on ovariectomy-induced bone loss in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 579, no. 1-3, s. 241-245.
- 30) HATZIGEORGIOU, C. – JACKSON, J.L. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors and osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporosis International*, 2005, vol. 16, no. 8, s. 990-998.
- 31) HERRMANN, M. – SEIDEL, M.J. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clinica Chimica Acta*, 2008, vol. 393, no. 2, s. 57-75.
- 32) HVARFNER, A. – BERGSTRÖM, R. – MÖRLIN, C. – WIDE, L. – LJUNGHALL, S. Relationships between calcium metabolic indices and blood pressure in patients with essential hypertension as compared with a healthy population. *Journal of Hypertension*, 1987, vol. 5, no. 4, s. 451-456.
- 33) IZAWA, Y. – SAGARA, K. – KADOTA, T. – MAKITA, T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcified Tissue International*, 1985, vol. 37, no. 6, s. 605-607.
- 34) JADHAV, S.B. – JAIN, G.K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2006, vol. 58, no. 1, s. 3-18.
- 35) JEU, L. – CHENG, J.W. Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH 58235), a cholesterol - absorption inhibitor. *Clinical Therapeutics*, 2003, vol. 25, no. 9, s. 2352-2387.
- 36) KANAZAWA, I. – YAMAGUCHI, T. – YAMAUCHI, M. – SUGIMOTO, T. Rosuvastatin increased serum osteocalcin levels independent of its serum cholesterol-lowering effect in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Internal Medicine*, 2009, vol. 48, no. 21, s. 1869-1873.

- 37) KASUKAWA, Y. – MIYAKOSHI, N. – MOHAN, S. The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, vol. 10, no. 21, s. 2577-2592.
- 38) KATAGIRI, T. – TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*, 2002, vol. 8, no. 3, s. 147-159.
- 39) KE, H.Z. – CRAWFORD, D.T. – QI, H. – CHIDSEY-FRINK, K.L. – SIMMONS, H.A. – LI, M. – JEE, W.S. – THOMPSON, D.D. Long-term effects of aging and orchidectomy on bone and body composition in rapidly growing male rats. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2001, vol. 1, no. 3, s. 215-224.
- 40) KRAMER, W. – GLOMBIK, H. – PETRY, S. – HEUER, H. – SCHÄFER, H. – WENDLER, W. – CORSIERO, D. – GIRBIG, F. – WEYLAND, C. Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter. *FEBS Letters*, 2000, vol. 487, no. 2, s. 293-297.
- 41) KURIHARA, N. – ISHIZUKA, S. – KIYOKI, M. – HAKETA, Y. – IKEDA, K. – KUMEGAWA, M. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology*, 1986, vol. 118, no. 3, s. 940-947.
- 42) Lee, A.J. – Hodges, S. – Eastell, R. Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2000, vol. 37, s. 432-446.
- 43) LIAO, J.K. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *International Journal of Cardiology*, 2002, vol. 86, no. 1, s. 5-18.
- 44) LIEBERHERR, M. Effects of vitamin D3 metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, vol. 262, no. 27, s. 13168-13173.
- 45) LIEBERMAN, J.R. – DALUISKI, A. – EINHORN, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2002, vol. 84-A, no. 6, s. 1032-1044.
- 46) LORENTZON, M. – SWANSON, C. – ERIKSSON, A.L. – MELLSTRÖM, D. – OHLSSON, C. Polymorphisms in the aromatase gene predict areal BMD as a result of affected cortical bone size: the GOOD study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, vol. 21, no. 2, s. 332-339.

- 47) MAEDA, T. – KAWANE, T. – HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*, 2003, vol. 144, no. 2, s. 681-692.
- 48) MAJIMA, T. – KOMATSU, Y. – FUKAO, A. – NINOMIYA, K. – MATSUMURA, T. – NAKAO, K. Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia. *Endocrine Journal*, 2007, vol. 54, no. 1, s. 145-151.
- 49) MAJIMA, T. – SHIMATSU, A. – KOMATSU, Y. – SATOH, N. – FUKAO, A. – NINOMIYA, K. – MATSUMURA, T. – NAKAO, K. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. *Endocrine Journal*, 2008, vol. 55, no. 1, s. 143-151.
- 50) MALHOTRA, H.S. – GOA, K.L. Atorvastatin: and updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. *Drugs*, 2001, vol. 61, no. 12, s. 1835-1881.
- 51) MARITZ, F.J. – CONRADIE, M.M. – HULLEY, P.A. – GOPAL, R. – HOUGH, S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001, vol. 21, no. 10, s. 1636-1641.
- 52) MCCARRON, D.A. – PINGREE, P.A. – RUBIN, R.J. – GAUCHER, S.M. – MOLITCH, M. – KRUTZIK, S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension*, 1980, vol. 2, no. 2, s. 162-168.
- 53) MCCORMICK, R.K. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Alternative Medicine Review*, 2007, vol. 12, no. 2, s. 113-145.
- 54) MEISINGER, C. – HEIER, M. – LANG, O. – DÖRING, A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporosis International*, 2007, vol. 18, no. 9, s. 1189-1195.
- 55) MIYAZAKI, T. – MATSUNAGA, T. – MIYAZAKI, S. – HOKARI, S. – KOMODA, T. Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid

- phosphatase in ovariectomized rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 93, no. 3, s. 503-512.
- 56) MOORE, R.E. – SMITH, C.K. 2ND – BAILEY, C.S. – VOELKEL, E.F. – TASHJIAN, A.H. JR. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone and Mineral*, 1993, vol. 23, no. 3, s. 301-315.
- 57) MORAES, R.B. – CORRÊA, L. – LUZ, J.G. Adverse effects of the amlodipine on bone healing of the mandibular fracture: an experimental study in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2011, Jun; vol. 15, no. 2, s. 93-101.
- 58) MORAIN, P. – PEGLION, J.L. – GIESEN-CROUSE, E. Ca²⁺ channel inhibition in a rat osteoblast-like cell line, UMR 106, by a new dihydropyridine derivative, S11568. *European Journal of Pharmacology*, 1992, vol. 220, no. 1, s. 11-17.
- 59) MUNDY, G. – GARRETT, R. – HARRIS, S. – CHAN, J. – CHEN, D. – ROSSINI, G. – BOYCE, B. – ZHAO, M. – GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 1999, vol. 286, no. 5446, s. 1946-1949.
- 60) NAKATANI, Y. – TSUNOI, M. – HAKEDA, Y. – KURIHARA, N. – FUJITA, K. – KUMEGAWA, M. Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 123, no. 3, s. 894-898.
- 61) NELLEMAN, B. – GORMSEN, L.C. – DOLLERUP, J. – SCHMITZ, O. – MOGENSEN, C.E. – RASMUSSEN, L.M. – NIELSEN, S. Simvastatin reduces plasma osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care*, 2007, vol. 30, no. 12, 3122-3124.
- 62) NISHIYA, Y. – SUGIMOTO, S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, vol. 24, no. 6, s. 628-633.
- 63) ONWUKA, F.C. – PATRICK-I WUANYANWU, K.C. – NNODU, C.K. – ERHABOR, O. Effect of amlodipine, a calcium channel antagonist, on gonadal steroid of male Wistar albino rats. *Journal of Experimental Pharmacology*, 2010, vol. 2010, no. 2, s. 55-58.

- 64) OROZCO, P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal women. *European Journal of Epidemiology*, 2004, vol. 19, no. 12, s. 1105-1112.
- 65) ORWOLL, E.S. Androgens: basic biology and clinical implication. *Calcified Tissue International*, 2001, vol. 69, no. 4, s. 185-188.
- 66) Paduch, D.A. – Bolyakov, A. – Kipper, J. – Pacík, D. Osteopenie a osteoporóza u infertilitních mladých mužů trpících sexuální dysfunkcí – klinická zkušenost. *Urologické Listy*, 2008, roč. 6, č. 4, s. 40-53.
- 67) PALIČKA, Vladimír – BLAHOŠ, Jaroslav – BÝMA, Svatopluk. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. *Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře. Osteoporóza : doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře 2011*. Praha : Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2011. 12 s. ISBN: 978-80-86998-44-2. Kapitola 3, Diagnóza osteoporózy, s. 4-5.
- 68) PARHAMI, F. – JACKSON, S.M. – TINTUT, Y. – LE, V. – BALUCAN, J.P. – TERRITO, M. – DEMER, L.L. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1999, vol. 14, no. 12, s. 2067-2078.
- 69) PARHAMI, F. – TINTUT, Y. – BEAMER, W.G. – GHARAVI, N. – GOODMAN, W. – DEMER, L.L. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, vol. 16, no. 1, s. 182-188.
- 70) PASCO, J.A. – HENRY, M.J. – SANDERS, K.M. – KOTOWICZ, M.A. – SEEMAN, E. – NICHOLSON, G.C. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, vol. 19, no. 1, s. 19-24.
- 71) PFEILSCHIFTER, J. KÖDITZ, R. – PFOHL, M. – SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews*, 2002, vol. 23, no. 1, s. 90-119.
- 72) PIVONKA, P. – ZIMAK, J. – SMITH, D.W. – GARDINER, B.S. – DUNSTAN, C.R. – SIMS, N.A. – MARTIN, T.J. – MUNDY, G.R. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling. *Journal of Theoretical Biology*, 2010, vol. 262, no. 2, s. 306-316.

-
- 73) POOLE, K.E. – COMPSTON, J.E. Osteoporosis and its management. *British Medical Journal*, 2006, vol. 333, no. 7581, s. 1251-1256.
- 74) RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol. 115, no. 12, s. 3318-3325.
- 75) REJNMARK, L. – BUUS, N.H. – VESTERGAARD, P. – ANDREASEN, F. – LARSEN, M.L. – MOSEKILDE, L. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Investigation*, 2002, vol. 32, no. 8, s. 581-589.
- 76) REJNMARK, L. – VESTERGAARD, P. – MOSEKILDE, L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *Journal of Hypertension*, 2006, vol. 24, no. 3, s. 581-589.
- 77) REJNMARK, L. – VESTERGAARD, P. – KASSEM, M. – CHRISTOFFERSEN, B.R. – KOLTHOFF, N. – BRIKEN, K. – MOSEKILDE, L. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcified Tissue International*, 2004, vol. 75, no. 5, s. 365-372.
- 78) REN, S.G. – MALOZOWSKI, S. – SANCHEZ, P. – SWEET, D.E. – LORIAUX, D.L. – CASSORLA, F. Direct administration of testosterone increases rat tibial epiphyseal growth plate width. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 1989, vol. 121, no. 3, s. 401-405.
- 79) RITCHIE, C.K. – MAERCKLEIN, P.B. – FITZPATRICK, L.A. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology*, 1994, vol. 135, no. 3, s. 996-1003.
- 80) ROSENKRANZ, A.C. – LOB, H. – BREITENBACH, T. – BERKELS, R. – ROESEN, R. Endothelial antioxidant actions of dihydropyridines and angiotensin converting enzyme inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 2006, vol. 529, no. 1-3, s. 55-62.
- 81) ROENSON, R.S. – TANGNEY, C.C. – LANGMAN, C.B. – PARKER, T.S. – LEVINE, D.M. – GORDON, B.R. Short-term reduction in bone markers with high-dose simvastatin. *Osteoporosis International*, 2005, vol. 16, no. 10, s. 1272-1276.

-
- 82) RUDEL, L.L. Preclinical and clinical pharmacology of a new class of lipid management agents. *The American Journal of Managed Care*, 2002, vol. 8, no. 2, s. S33-S35.
- 83) RUIZ-GASPA, S. – NOGUES, X. – ENJUANES, A. – MONLLAU, J.C. – BLANCH, J. – CARRERAS, R. – MELLIBOVSKY, L. – GRINBERG, D. – BALCELLS, S. – DÍEZ-PÉREZ, A. – PEDRO-BOTET, J. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, vol. 101, no. 6, s. 1430-1438.
- 84) RŮŽIČKOVÁ O. Opomíjený problém geriatric: osteoporóza mužů. *Česká geriatrická revue*, 2008, roč. 6, č. 2, s. 73-82.
- 85) SATO, T. – ARAI, M. – GOTO, S. – TOGARI, A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2010, vol. 334, no. 1, s. 99-105.
- 86) SERTBAS, Y. – ERSOY, U. – AYTER, M. – GULTEKIN TIRTEL, F. – KUCUKKAYA, B. Ezetimibe effect on bone mineral density and markers of bone formation and resorption. *Journal of Investigative Medicine*, 2010, vol. 58, no. 2, s. 295-297.
- 87) SHEPHERD, J. Lipids in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 2004, vol. 32, no. Pt 6, s. 1051-1056.
- 88) SHIMIZU, H. – NAKAGAMI, H. – OSAKO, M.K. – HANAYAMA, R. – KUNUGIZA, Y. – KIZAWA, T. – TOMITA, T. – YOSHIKAWA, H. – OGIHARA, T. – MORISHITA, R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008, vol. 22, no. 7, s. 2465-2475.
- 89) SCHLIENGER, R.G. – KRAENZLIN, M.E. – JICK, S.S. – MEIER, C.R. Use of beta-blockers and risk of fractures. *The Journal of the American Medical Association*, 2004, vol. 292, no. 11, s. 1326-1332.
- 90) Souhrn údajů o přípravku Caduet. Pfizer ČR, revize textu 25. 8. 2010
- 91) STERN, R.H. – YANG, B.B. – HOUNSLOW, N.J. – MACMAHON, M. – ABEL, R.B. – OLSON, S.C. Pharmacodynamics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2000, vol. 40, no. 6, s. 616 - 623.

-
- 92) SWARTHOUT, J.T. - D'ALONZO, R.C. – SELVAMURUGAN, N. – PARTRIDGE, N.C. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 2002, vol. 282, no. 1-2, s. 1-17.
- 93) ŠTĚPÁN, J. Osteoporóza a cíle její léčby. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2005, roč. 19, č. 4, s. 229-234.
- 94) TAKEDA, S. – ELEFTERIOU, F. – LEVASSEUR, R. – LIU, X. – ZHAO, L. – PARKER, K.L. – ARMSTRONG, D. – DUCY, P. – KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell Press*, 2002, vol. 111, no. 3, s. 305-317.
- 95) TANKÓ, L.B. – BAGGER, Y.Z. – NIELSEN, S.B. – CHRISTIANSEN, C. Does serum cholesterol contribute to vertebral bone loss in postmenopausal women? *Bone*, 2003, vol. 32, no. 1, 8-14.
- 96) TINTUT, Y. – MORONY, S. – DEMER, L.L. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, vol. 24, no. 2, s. e6-10.
- 97) TINTUT, Y. – PARHAMI, F. – TSINGOTJIDOU, A. – TETRADIS, S. – TERRITO, M. – DEMER, L.L. 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 16, s. 14221-14226.
- 98) TSUDA, K. – NISHIO, I. – MASUYAMA, Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 2001, vol. 14, no. 7 Pt 1, s. 704-707.
- 99) TURKER, S. – KARATOSUN, V. – GUNAL, I. Beta-blockers increase bone mineral density. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2006, vol. 443, s. 73-74.
- 100) TURNER, C.H. – BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 1993, vol. 14, no. 4, s. 595-608.
- 101) UELAND, T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *European Journal of Endocrinology*, 2005, vol. 152, no. 3, s. 327-332.
- 102) URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, vol. 150, no. 3698, s. 893-899.

- 103) USHIJIMA, K. – LIU, Y. – MAEKAWA, T. – ISHIKAWA, E. – MOTOSUGI, Y. – ANDO, H. – TSURUOKA, S. – FUJIMURA, A. Protective effect of amlodipine against osteoporosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 2010, vol. 635, no. 1-3, s. 227-230.
- 104) UYAR, Y. – BAYTUR, Y. – INCEBOZ, U. – DEMIR, B.C. – GUMUSER, G. – OZBILGIN, K. Comparative effects of risedronate, atorvastatin, estrogen and SERMs on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Maturitas*, 2009, vol. 63, no. 3, 261-267.
- 105) VAN HEEK, M. – FARLEY, C. – COMPTON, D.S. – HOOS, L. – ALTON, K.B. – SYBERTZ, E.J. – DAVIS, H.R. JR. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *British Journal of Pharmacology*, 2000, vol. 129, no. 8, s. 1748-1754.
- 106) VAN HEEK, M. – FARLEY, C. – COMPTON, D.S. – HOOS, L. – DAVIS, H.R. Ezetimibe selectively inhibits intestinal cholesterol absorption in rodents in the presence and absence of exocrine pancreatic function. *British Journal of Pharmacology*, 2001, vol. 134, no. 2, s. 409-417.
- 107) VANDERSCHUEREN, D. – VANDENPUT, L. – BOONEN, S. – VAN HERCK, E. – SWINNEN, J.V., BOUILLON, R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endocrinology*, 2000, vol. 141, no. 5, s. 1642-1647.
- 108) VERHAS, M. – SCHOUTENS, A. – L'HERMITE-BALERIAUX, M. – DOUROV, N. – VERSCHAEREN, A. – MONE, M. – HEILPORN, A. The effect of orchidectomy on bone metabolism in aging rats. *Calcified Tissue International*, 1986, vol. 39, no. 2, s. 74-77.
- 109) VIREECK, V. – GRÜNDKER, C. – BLASCHKE, S. – FROSCH, K.H. – SCHOPPET, M. – EMONS, G. – HOFBAUER, L.C. Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, vol. 96, no. 6, s. 1244-1253.
- 110) VÍTOVEC, Jiří - ŠPINAR, Jindřich. a kol. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. 2. vyd. Praha : Grada Publishing, 2004. 248 s. ISBN 80-247-0866-3. Kapitola 3, Beta-blokátory (BB), s. 53-66.

-
- 111) WINK, C.S. – FELTS, W.J. Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis. *Calcified Tissue International*, 1980, vol. 32, no. 1, s. 77-82.
- 112) YAMAGUCHI, A. – KATAGIRI, T. – IKEDA, T. – WOZNEY, J.M. – ROSEN, V. – WANG, E.A. – KAHN, A.J. – SUDA, T. – YOSHIKI, S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 1991, vol. 113, no. 3, s. 681-687.
- 113) YAMAGUCHI, A. – SAKAMOTO, K. – MINAMIZATO, T. – KATSUBE, K. – NAKANISHI, S. Regulation of osteoblast differentiation mediated by BMP, Notch, and CCN3/NOV. *Japanese Dental Science Review*, 2008, vol. 44, no. 1, s. 48-56.
- 114) YANG, S. – NGUYEN, N.D. – CENTER, J.R. – EISMAN, J.A. – NGUYEN, T.V. Association between beta-blocker use and fracture risk: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Bone*, 2011, vol. 48, no. 3, s. 451-455.
- 115) YAVUZ, B. – ERTUGRUL, D.T. – CIL, H. – ATA, N. – AKIN, K.O. – YALCIN, A.A. – KUCUKAZMAN, M. – DAL, K. – HOKKAOMEROGLU, M.S. – YAVUZ, B.B. – TUTAL, E. Increased levels of 25 hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D after rosuvastatin treatment: a novel pleiotropic effect of statins? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2009, vol. 23, no.4, s. 295-299.
- 116) ZAHANICH, I. – GRAF, E.M. – HEUBACH, J.F. – HEMPEL, U. – BOXBERGER, S. – RAVENS, U. Molecular and functional expression of voltage-operated calcium channels during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, vol. 20, no. 9, s. 1637-1646.