

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



**Sledování kostního metabolismu ovlivněného vybranými léky**

**Iveta Gradošová**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Klinická biochemie**

**Hradec Králové**

**2012**

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a FN v Hradci Králové.

- Autor: Mgr. Iveta Gradošová  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF UK a FN v Hradci Králové
- Školitel: doc. MUDr. Helena Živná, CSc.  
Radioizotopové laboratoře a Vivárium  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Univerzita Karlova v Praze
- Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF UK a FN v Hradci Králové
- Oponenti: prof. MUDr. Petr Broulík, DrSc.  
III. interní klinika - klinika endokrinologie a metabolismu, 1. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
- prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc.  
Osteocentrum Ústřední vojenské nemocnice  
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Obhajoba disertační práce se uskuteční před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Klinické biochemie dne.....v.....hodin v ..... Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

MZO 00179906

grant Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové s podporou firmy Roche

SVV-2010-62051

SVV-2011-262902

SVV-2012-264902

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr. h. c.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Klinická biochemie

## Obsah

1.	Souhrn.....	4
2.	Summary .....	5
3.	Úvod do problematiky.....	6
3.1	Markery kostního obratu .....	6
3.2	Dvouenergiová rentgenová absorpciometrie .....	6
3.3	Regulace remodelace kostní tkáně.....	7
3.3.1	Androgeny .....	7
3.3.2	Insulinu podobný růstový faktor (IGF-1; Insulin like Growth Factor 1).....	7
3.3.3	Kostní morfogenetické proteiny (BMP).....	7
3.3.4	RANK/RANKL/OPG .....	7
3.4	Vliv arteriální hypertenze na kostní metabolismus .....	8
3.5	Vliv hypercholesterolemie na kostní metabolismus .....	8
3.6	Léčiva ze skupiny hypercholesterolemik a antihypertenziv .....	8
3.6.1	Ezetimib .....	8
3.6.2	Atorvastatin.....	9
3.6.3	Amlodipin.....	9
3.6.4	Metoprolol .....	10
4.	Cíle disertační práce.....	11
5.	Experimentální část.....	12
5.1	Podávané léky.....	12
5.2	Experimenty .....	12
5.3	Materiál a metody.....	13
5.3.1	Stanovení kostních markerů.....	13
5.3.2	Stanovení koncentrace lipidů v séru a vápníku v séru a v tibiai .....	13
5.3.3	Měření kostní minerální hustoty .....	13
5.3.4	Testování mechanické odolnosti kostní tkáně.....	14
5.3.5	Stanovení množství kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) metodou Western blot .....	14
5.3.6	Statistická analýza a zpracování dat.....	14
6.	Výsledky.....	15
6.1	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů .....	15
6.1.1	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar .....	15
6.2	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů .....	15
6.2.1	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar .....	15
6.2.2	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar .....	15
6.3	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů.....	16
6.3.1	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar.....	16
6.3.2	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar .....	16
6.3.3	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů .....	17
6.4	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů .....	17
6.4.1	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar .....	17
6.4.2	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar .....	17
6.4.3	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných spontánně hypertenzních potkanů .....	18
6.5	Vliv kombinace léčiv amlodipinu a atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů.....	18
6.5.1	Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar .....	18
7.	Diskuse.....	19
7.1	Vliv orchidektomie u potkanů .....	19
7.2	Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů .....	20
7.3	Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů .....	20
7.4	Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů.....	21
7.5	Vliv kombinace léčiv amlodipinu+atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů .....	22
7.6	Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů .....	22
8.	Závěry .....	24
9.	Použitá literatura .....	25
10.	Přehled přednáškové a publikační činnosti.....	31
7.7	Původní vědecké práce s impakt faktorem .....	31
7.8	Publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech.....	31
7.9	Původní vědecké práce v recenzním řízení.....	32
7.10	Posterová sdělení.....	32
7.11	Odborná přednáška.....	32

## 1. Souhrn

### Sledování kostního metabolismu ovlivněného vybranými léky

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 prokázán 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 jeví 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 umožňují 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  $\beta$ -blokátorů vykazuje rozporupný 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.

## 2. Summary

### Monitoring of bone metabolism affected by selected drugs

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.  $\beta$ -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.

### 3. 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 monocyt - 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.

#### 3.1 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 novotvorby patří kostní izoforma alkalické fosfatázy (BALP), osteokalcin (OC) a N- a C-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, P1CP). 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 osteoresorpce, pomáhá tedy při diagnóze onemocnění a informuje o účinnosti léčby.

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).

Osteokalcin představuje hlavní nekolagenní protein v kostní tkáni, který je secernovaný převážně osteoblasty a při novotvorbě kostní tkáně je z části uvolňován do systémové cirkulace. Podílí se na mineralizaci kosti. K jeho tvorbě jsou zapotřebí kalcitriol a vitamín K. OC má velmi krátký biologický poločas a dochází k jeho vylučování ledvinami. 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).

Kolagen typu I představuje hlavní součást organické kostní matrix. Tvorba probíhá v osteoblastech, ze kterých je secernován jako prekurzor prokolagen I. PINP a P1CP 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- a N-telopeptidy kolagenu s příčnými vazbami tzv. cross-links (CTX a NTX) vlivem katepsinu K. Tyto markery vypovídají o resorpce kostní tkáně (Hermann a Seidel, 2008).

#### 3.2 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<sup>2</sup>). BMD je u pacientů standardně měřena v oblasti bederní páteře (L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub>) 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). 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 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 nejlépe v ročních odstupech (Palička *et al.*, 2011).

### 3.3 Regulace remodelace kostní tkáně

#### 3.3.1 Androgeny

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).

Testosteron se přeměňuje v periferních tkáních (skelet) na účinnější androgen, 5- $\alpha$ -dihydrotestosteron, působením 5 $\alpha$ -reduktázy. Také může být konvertován na 17 $\beta$ -estradiol pomocí P450 aromatazy, která je přítomná též v kostní tkáni, a následně aktivovat estrogenní receptory- $\alpha$  a  $\beta$  (ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) (Callewaert *et al.*, 2009).

Testosteron, cestou aktivace receptorů na osteoblastech, zprostředkovává proliferaci a diferenciaci osteoblastů, produkci růstových faktorů, cytokinů (transformující růstový faktor beta; TGF- $\beta$ ), snížení sekrece interleukinu 6 a prostagandinu E<sub>2</sub> (Clarke a Khosla, 2009). Androgeny jsou zodpovědné za prodlužování kostí přímým účinkem na chondrocyty růstových plotének (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 epifyzy a ukončení růstu skeletu (Paduch *et al.*, 2008).

Po 3 měsících od provedené orchidektomie u myší 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 deficiencie 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).

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

IGF-1 je syntetizován mnoha tkáněmi včetně skeletu (růstový faktor produkovaný osteoblasty). Jeho expresi v osteoblastech stimuluje parathormon (PTH) a estradiol (Ernst a Rodan, 1991). 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 kalcitriolu 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).

#### 3.3.3 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- $\beta$ , 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).

#### 3.3.4 RANK/RANKL/OPG

Diferenciaci a aktivitu osteoklastů zprostředkovávají samy osteoblasty. Osteoblasty exprimují na svém povrchu RANKL. Stimulátory kostní resorpce např. parathormon, kalcitriol 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) 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).

### 3.4 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 environmentálních 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). Spontánně hypertenzní potkan kmene SHR je nejčastěji používaný experimentální model esenciální hypertenze a jeví se být vhodným modelem osteoporózy (Sato *et al.*, 2010).

### 3.5 Vliv hypercholesterolemie na kostní metabolismus

Hypercholesterolemie 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. Hypercholesterolemie 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 hypercholesterolemií nárůst sérové koncentrace NTX u žen i mužů a BALP pouze u žen. Výsledky z literatury naznačují zvýšený kostní obrát u pacientů jak s hypercholesterolemií, tak s dislipidemií bez ohledu na pohlaví.

### 3.6 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.

#### 3.6.1 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 blokádu transportního proteinu Niemann - Pick C1 like protein 1 (Altmann *et al.*, 2004; Shepherd, 2004; Kramer *et al.*, 2000). 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. Neboť 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 (lipoproteiny s nízkou hustotou) a zvyšuje HDL (lipoproteiny s vysokou hustotou), v menší míře také snižuje TAG u pacientů s hypercholesterolemií (Jeu a Cheng, 2003).

Po tříměsíčním podávání ezetimibu (10 mg/den) pacientům s diagnostikovanou hypercholesterolemií a s *diabetes mellitus* 2. typu nedošlo k statisticky významné změně v sérových koncentracích ukazatelů kostního obrátu (Kanazawa *et al.*, 2009). Sertbas *et al.* (2010) zkoumali vliv ezetimibu podávaném ve stejné dávce (10 mg/den) u pacientů s hypercholesterolemií 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.

### 3.6.2 Atorvastatin

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. Farnesylpyrofosfát syntetáza je blokována bisfosfonáty, které jsou již mnoho let úspěšně používány v léčbě osteoporózy. Statiny a bisfosfonáty tedy inhibují stejnou biochemickou cestu endogenní syntézy cholesterolu.

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).

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. Dále bylo zjištěno, že atorvastatin zvyšuje *in vitro* expresi dalších ukazatelů diferenciaci osteoblastů - kolagen I, BALP, OC, OPG (Viereck *et al.*, 2005; Ruiz-Gaspa *et al.*, 2007). Atorvastatin také stimuluje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje diferenciaci osteoblastů, potlačení prenylace proteinů a aktivaci signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (Maeda *et al.*, 2003).

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 anti-resorpční účinek (Jadhav a Jain, 2006). Práce pocházející od Maritz *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.

### 3.6.3 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).

Osteoblasty, pocházející z nediferencovaných mezenchymálních buněk dřevňového stromatu, mají hlavní roli v tvorbě kostní hmoty a v dotváření mineralizované kosti. Během své aktivace exprimují kolagen typu I, BALP a OC. Bylo prokázáno, že osteoblasty také exprimují napětově kalciové kanály (Duncan *et al.*, 1998). Kalciový kanál L-typu byl objeven i na potkaních osteoblast-like buňkách (Morain *et al.*, 1992). Některé regulátory kostního metabolismu, vitamín  $D_3$ , parathormon a prostaglandin  $E_2$ , 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,  $17\beta$ -estradiol) též ovlivňují expresi kanálů L-typu a jejich funkční zapojení do kostní remodelace (Gu *et*

*al.*, 2001). Během diferenciací 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 dávkách 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 dávkách 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.

Moraes *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 významu testosteronu pro správnou funkci kostního metabolismu lze podle těchto zjištění očekávat naopak negativní vliv amlodipinu na kostní tkáň.

### 3.6.4 Metoprolol

Mechanismus účinku snižování krevního tlaku  $\beta$ -blokátory (metoprolol) spočívá v tom, že snižují srdeční výdej v důsledku blokády srdečních  $\beta_1$ -receptorů. Následkem je pokles srdeční frekvence a snížení kontraktility myokardu, což vede ke snížení nároků myokardu na kyslík. Proto  $\beta$ -blokátory mají současně antiarytmický a antianginózní účinek (Vítovec *et al.*, 2004).

Metoprolol je lipofilní  $\beta_1$ -selektivní blokátor adrenergických receptorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity a zmírňuje účinky zvýšené sympatomimetické aktivity na srdce. Kardioselektivita metoprololu je nespecifická, závisí na poměru afinity účinné látky k oběma typům receptorů (Vítovec *et al.*, 2004). Metoprolol až při vyšších dávkách blokuje  $\beta_2$  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  $\beta_2$ -receptory osteoblastů a tím inhibuje jejich aktivitu (Takeda *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2008). Navíc, stimulací  $\beta_2$ -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  $\beta$ -blokátorech a jejich vlivu na kostní metabolismus jsou nejednotná. Většina dosavadních studií uvádějí, že užívání  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -blokátory samotné nebo v kombinaci s thiazidovými diuretiky snižují riziko zlomeniny u lidí s incidencí fraktury ve středním a pokročilém věku.

## 4. 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 tibií
2. Zjištění vlivu léků na kostní minerální hustotu:
  - změření kostní minerální hustoty (BMD) potkana pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie
  - preparace femurů 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

## 5. Experimentální část

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. 39/2009 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). 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.

### 5.1 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)

#### *rozpuštědlo 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)

### 5.2 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.

#### 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 analgesedaci (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)

## 5.3 Materiál a metody

### 5.3.1 Stanovení kostních markerů

Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové narkóze ve viváriu UK-LF HK. Koncentrace kostních markerů (CTX-I, PINP, OC, BALP, BMP-2, IGF-1, OPG) byly stanoveny v získaném krevním séru a v kostním homogenátu připraveny z proximální části tibie pomocí metody ELISA. Byly použity kity od firem Immunodiagnostic Systems Ltd., Velká Británie a Usnclife Sciences & Technology Co., Ltd, Čína dle pokynů výrobce.

### 5.3.2 Stanovení koncentrace lipidů v séru a vápníku v séru a v tibii

Biochemické vyšetření spektra lipidů v séru – celkového cholesterolu, HDL a LDL, TAG a atrogenního 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).

### 5.3.3 Měření kostní minerální hustoty

Na konci pokusu byla potkanům změněna celotělová kostní minerální hustota pomocí dvouenergieové rentgenové absorpciometrie 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, a také byla stanovena hmotnost svalové a tukové tkáně a procentuální zastoupení tukové tkáně. Byla také hodnocena BMD celého vypreparovaného femuru, dále proximální části, diafýzy a distální části femuru.

### 5.3.4 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). Před testováním byla změřena délka a průměr femuru. 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. 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 byla změřena tloušťka kompakty na distální části femuru ve směru lámání pomocí posuvného mikrometru.

Dále byla testována tlaková odolnost krčku femuru, neboť převážná část osteoporotických zlomenin vzniká právě v této oblasti. K testování tlakové odolnosti krčku femuru byla využita proximální část kosti. Diafýza kosti byla zalita samopolymérizující adhezivní pryskyřicí na bázi metakrylátu (Spofacryl-SpofaDental a.s.; Jičín, Česká Republika) do speciální nádoby a tím byla kost zafixována ve svislé poloze. Opět byla použita počáteční síla do 10 N k zajištění stabilního místa tlaku a konstantní rychlost nerezové tyčky se zakulaceným koncem 6 mm/min. 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).

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

Pro přípravu homogenátu byla využita proximální část tibie (100 mg). 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. Na gel bylo nanášeno stejné množství proteinů (200 µg). Po rozdělení proteinů nastal jejich přenos („western blotting“) na PVDF membránu. Membrána byla blotována v TBS/Tween s 5% mlékem (Non-fat dry milk, Bio-Rad) a inkubována s primární protilátkou Monoclonal Anti-β-actin antibody produced in mouse clone AC-74, ascites fluid (ředění 1:250; A5316, Sigma-Aldrich, USA) při 4 °C přes noc. Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (ředění 1:1000; P 0447, Dako, Dánsko). Detekce imunokomplexů byla provedena chemiluminiscenčně pomocí ECL kitu (ECL, Chemiluminiscence blotting substrate, Roche, Německo) s následnou expozicí filmu (Foma, Hradec Králové). Porovnání skupin, kterým bylo podáváno vybrané léčivo s kontrolní skupinou, bylo provedeno pouze kvalitativně. Správné nanášení vzorků na gel bylo ověřeno imunodetekcí β-aktinu.

### 5.3.6 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 ± směrodatná odchylka (SD), v případě zamítnuté normality jako medián a mezikvartilové rozpětí (25.-75. percentil). Ke grafickému znázornění byly použity krabíčkové grafy (Box plot), kde byly označeny skupiny, které se statisticky významně lišily od příslušné kontroly. Hladina významnosti byla zvolena  $\alpha=0,05$ .

## 6. Výsledky

### 6.1 Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů

#### 6.1.1 Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u zdravých samců potkanů kmene Wistar

Po 8 týdnech podávání ezetimibu v dávce 1 mg/kg BW zdravým samcům potkanů kmene Wistar nedošlo k statisticky významným změnám v sérových koncentracích kostních markerů, kostní minerální hustoty v hodnocených oblastech, mechanických vlastnostech femurů, a ani v množství kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální tibi v porovnání s kontrolní skupinou.

### 6.2 Vliv atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů

#### 6.2.1 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 % ( $p < 0,01$ ) v porovnání s kontrolní skupinou. Kostní izoforma alkalické fosfatázy se snížila též i v kostním homogenátu z proximální části tibiae, ale statisticky nevýznamně. U ostatních markerů kostního obratu nebyla prokázána signifikantní změna v koncentracích mezi skupinami.

Naměřené hodnoty kostní minerální hustoty ve všech hodnocených oblastech neprokázaly signifikantní rozdíl mezi skupinami.

Mechanické hodnocení femurů neprokázalo statisticky významné změny mezi skupinami. Pouze průměr levého femuru byl signifikantně menší ( $p < 0,05$ ) v porovnání s kontrolou. V ostatních hodnocených parametrech se femury signifikantně nelišily.

Množství BMP-2 v proximální části tibiae se po 8 týdnech podávání atorvastatinu signifikantně vzrostlo v porovnání s kontrolou.

#### 6.2.2 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.

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.

Stanovením lipidového spektra v séru byl ověřen hypolipidemický účinek atorvastatinu. Po 12 týdnech podávání atorvastatinu došlo k signifikantnímu poklesu triacylglycerolů ( $p < 0,01$ ) a atoregenního indexu ( $p < 0,01$ ), dále k 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 ( $p < 0,01$ ) v porovnání se skupinou sham.

Ani provedená orchidektomie, a ani podávaný atorvastatin signifikantně neovlivnily množství vápníku v séru a v tibi mezi skupinami.

Vlivem orchidektomie došlo k statisticky významnému nárůstu koncentrací BALP ( $p < 0,05$ ), CTX-I ( $p < 0,001$ ) a BMP-2 ( $p < 0,01$ ) v porovnání s sham. Po podávání atorvastatinu byl prokázán signifikantní pokles CTX-I ( $p < 0,001$ ), BMP-2 ( $p < 0,05$ ) a OPG ( $p < 0,01$ ) v porovnání s kontrolou. Atorvastatin také zvýšil sérovou hladinu IGF-1 ( $p < 0,001$ ) vs. kontrola. Tento růstový faktor byl vlivem orchidektomie signifikantně snížen u skupiny kontrola ( $p < 0,01$ ) vs. sham.

Byl potvrzen negativní vliv orchidektomie na kostní minerální hustotu, kdy došlo k statisticky významnému poklesu celotělové BMD ( $p < 0,001$ ), v oblasti obou femurů ( $p < 0,001$ ) a v oblasti bederních obratlů ( $p < 0,01$ ) v porovnání s sham. Dále na samotných vypreparovaných femurech byl prokázán signifikantní pokles BMD v diafýze levého ( $p < 0,05$ ) a pravého femuru ( $p < 0,01$ ), a celého pravého femuru ( $p < 0,01$ ) vs. sham. Po podání atorvastatinu došlo k signifikantnímu nárůstu celotělové BMD ( $p < 0,05$ ), v hodnocených oblastech skeletu byl též patrný nárůst BMD, ale statisticky nevýznamný v porovnání s kontrolní skupinou.

Vlivem orchidektomie došlo ke zpomalení růstu kostí, což potvrzují naměřené hodnoty délky ( $p < 0,001$ ) a průměru femurů (pouze levý femur;  $p < 0,05$ ), 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 ( $p < 0,01$ ), u pravého femuru je též patrný nesignifikantní pokles kortikalis vs. sham. Z toho vyplývá další zjištění poklesu tlakové síly u orchidektomované kontroly ve středu diafýzy levého i pravého femuru ( $p < 0,01$ ) vs. sham. Po 12 týdnech podávání atorvastatinu způsobil zlepšení růstu a vývoje kostní hmoty. Délka ( $p < 0,05$ ), průměr ( $p < 0,05$ ) a tloušťka kortikální části kosti ( $p < 0,01$ ) levého femuru byla signifikantně větší v porovnání s kontrolou. U pravého femuru byla naměřena pouze délka se statistickou významností ( $p < 0,05$ ) vs. kontrola, ostatní parametry vykazují nesignifikantní zvětšení vs. kontrola. Atorvastatin zvýšil pevnost kostní tkáně ve středu diafýzy ( $p < 0,01$ ) 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.

## 6.3 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u potkanů

### 6.3.1 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 obratu. Po jeho podávání byl prokázán pokles v séru CTX-I na 75 % ( $p < 0,01$ ), PINP na 73 % ( $p = 0,06$ ), OC ( $p = 42$ ) na 83 %, BALP na 12 % ( $p < 0,001$ ) a v kostním homogenátu BALP na 59 % ( $p < 0,05$ ) v porovnání s kontrolou.

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

Amlodipin způsobil signifikantní zesílení průměru ve středu diafýzy pouze u pravého femuru ( $p < 0,05$ ) vs. kontrola. Parametry mechanického testování femuru nevykazovaly statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

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

### 6.3.2 Vliv amlodipinu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar

Vlivem orchidektomie došlo k poklesu tělesné hmotnosti kontrolních potkanů ( $p < 0,01$ ) na konci experimentu a potkanů, kterým byl podáván amlodipin (3 mg/kg BW) na začátku i na konci experimentu ( $p < 0,01$ ) v porovnání se skupinou sham.

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.

Amlodipin způsobil pokles koncentrací markerů kostního obratu – CTX-I ( $p < 0,001$ ), PINP ( $p < 0,01$ ), BALP ( $p < 0,05$ ), BMP-2 ( $p < 0,01$ ), OPG ( $p < 0,05$ ) v porovnání s kontrolou. Naopak u kontrolní skupiny byl prokázán statisticky významný nárůst koncentrací CTX-I ( $p < 0,001$ ), BALP ( $p < 0,01$ ), BMP-2 ( $p < 0,05$ ) vs. sham. Pod vlivem amlodipinu došlo k signifikantnímu nárůstu IGF-1 ( $p < 0,01$ ) v séru vs. kontrola. Koncentrace IGF-1 vlivem orchidektomie statisticky významně klesla u kontroly ( $p < 0,01$ ) vs. sham.

Orchidektomie signifikantně snížila BMD celého těla ( $p < 0,001$ ), v oblasti bederních obratlů ( $p < 0,01$ ) a obou femurů ( $p < 0,001$ ) vs. sham. Na samotných femurech byl prokázán signifikantní pokles pouze celého pravého femuru ( $p < 0,01$ ) a jeho diafýzy ( $p < 0,01$ ) vs. sham. U skupiny amlodipin byla zjištěna signifikantně vyšší hodnota celotělové BMD ( $p < 0,05$ ) v porovnání s kontrolou.

Orchidektomie měla negativní vliv na růst a vývoj kostí. U skupiny amlodipin byl zjištěn signifikantně větší průměr ( $p < 0,05$ ) a tloušťka kortikální kosti ( $p < 0,01$ ) a zvětšila se maximální tlaková



síla nutná ke zlomení diafýzy ( $p < 0,05$ ) pouze u levého femuru vs. kontrola. U pravého femuru tyto parametry vykazují stejnou tendenci jako u levého, ale bez signifikance.

### **6.3.3 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. Po 12 týdnech ale orchidektomie způsobila statisticky významný pokles tukové tkáně ( $p < 0,01$ ) vs. sham.

Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v koncentraci vápníku v séru a v tibií mezi skupinami.

Vlivem orchidektomie došlo k zvýšení kostního obratu, které bylo prokázáno nárůstem koncentrací - PINP ( $p < 0,05$ ), CTX-I ( $p < 0,001$ ), BMP-2 ( $p < 0,001$ ), BALP ( $p < 0,001$ ) v porovnání se skupinou sham. U skupiny amlodipin byl zaznamenán signifikantní pokles CTX-I ( $p < 0,05$ ) a BMP-2 ( $p < 0,01$ ) vs. kontrola. Signifikantně nižší koncentrace IGF-1 byla naměřena u kontroly ( $p < 0,01$ ) vs. sham.

Hustota kostního minerálu byla u kontrolní skupiny statisticky významně snížena ve všech hodnocených oblastech skeletu - BMD celého těla ( $p < 0,001$ ), oblasti bederních obratlů ( $p < 0,001$ ), levého (LF,  $p < 0,01$ ) a pravého femuru (PF,  $p < 0,001$ ) a BMD vypreparovaných femurů - femur celý (LF  $p < 0,001$ ; PF  $p < 0,01$ ), proximální část (LF  $p < 0,001$ ; PF  $p < 0,01$ ), diafýza (LF  $p < 0,05$ ; PF  $p < 0,05$ ) v porovnání s sham. Po podávání amlodipinu nedošlo k statisticky významné změně BMD vs. kontrola.

Hodnocením mechanických vlastností femurů nebyly prokázány signifikantní změny mezi skupinami. Pouze délka pravého femuru byla statisticky významně menší u kontroly ( $p < 0,01$ ) vs. sham. Délka levého femuru byla též menší, ale bez statistické významnosti.

## **6.4 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů**

### **6.4.1 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 signifikantnímu ovlivnění koncentrací kostních markerů a hustoty kostního minerálu v porovnání s kontrolní skupinou.

Metoprolol způsobil statisticky významný pokles maximální tlakové síly nutné ke zlomení krčku pravého femuru ( $p < 0,01$ ) vs. kontrola. Hodnoty získané u levého femuru ale tento výsledek nepotvrdily. V ostatních sledovaných parametrech femurů nebyly nalezeny signifikantní změny mezi skupinami.

U skupiny metoprolol bylo prokázáno zvýšení koncentrace BMP-2 v proximální části tibiae v porovnání s kontrolní skupinou.

### **6.4.2 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných potkanů kmene Wistar**

Orchidektomie vedla k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti na začátku pokusu u skupiny metoprolol ( $p < 0,01$ ) a nesignifikantnímu poklesu u kontroly vs. sham. Na konci experimentu vlivem orchidektomie došlo k statisticky významnému poklesu u skupiny metoprolol ( $p < 0,001$ ) a kontrola ( $p < 0,01$ ) vs. sham. Metoprolol v dávce 54 mg/kg BW po 12 týdnech podávání způsobil signifikantní pokles tělesné hmotnosti ( $p < 0,05$ ) vs. kontrola.

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 ( $p < 0,05$ ) vs. kontrola.

Ani orchidektomie, ani metoprolol signifikantně neovlivnily koncentrace vápníku v séru a v tibií.

Stanovením koncentrací markerů kostního obratu CTX-I ( $p < 0,001$ ), BMP-2 ( $p < 0,01$ ) a BALP ( $p < 0,01$ ) byl zjištěn signifikantní nárůst u potkanů po provedení orchidektomie vs. sham. Hladina PINP a OPG statisticky nevýznamně vzrostla v porovnání s sham. Po podávání metoprololu došlo k signifikantnímu poklesu CTX-I ( $p < 0,001$ ), PINP ( $p < 0,01$ ), BMP-2 ( $p < 0,05$ ) a OPG ( $p < 0,001$ ), u BALP byl zaznamenán také patrný pokles, který ale nebyl statisticky významný vs. kontrola. Sérová hladina IGF-1 statisticky významně klesla u kontroly ( $p < 0,001$ ) vs. sham. Naopak u skupiny metoprolol signifikantně vzrostla ( $p < 0,01$ ) v porovnání s kontrolou, ale nedosáhla srovnatelné hladiny s sham.

U potkanů po orchidektomii bylo prokázáno signifikantní snížení BMD celého těla ( $p < 0,001$ ), v oblasti bederních obratlů ( $p < 0,05$ ), levého (LF  $p < 0,01$ ) a pravého femuru (PF  $p < 0,001$ ) v porovnání s sham. Po podání metoprololu nedošlo k signifikantní změně vs. kontrola.

U kontroly byla statisticky významně kratší délka (LF  $p < 0,01$ ; PF  $p < 0,001$ ), slabší průměr (LF  $p < 0,05$ ; PF  $p < 0,01$ ) i tloušťka kortikální části femuru (LF  $p < 0,01$ ; PF  $p < 0,05$ ) 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 (LF  $p < 0,01$ ; PF  $p < 0,05$ ) 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.

### **6.4.3 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, ale signifikantně snížila po 12 týdnech množství tukové tkáně ( $p < 0,01$ ) vs. sham.

Orchidektomie a metoprolol signifikantně neovlivnily množství vápníku v séru a v tibiai mezi skupinami.

Koncentrace markerů kostního obratu - PINP ( $p < 0,05$ ), CTX-I ( $p < 0,001$ ), BMP-2 ( $p < 0,001$ ), BALP ( $p < 0,01$ ) signifikantně vzrostla a sérová hladina IGF-1 ( $p < 0,01$ ) klesla vlivem provedené orchidektomie vs. sham. Po 12 týdnech podávání metoprololu byl prokázán signifikantní pokles PINP ( $p < 0,01$ ) a nesignifikantní pokles CTX-I, BMP-2 a BALP vs. kontrola.

Orchidektomie způsobila signifikantní pokles BMD ve všech hodnocených oblastech skeletu - BMD celého těla ( $p < 0,001$ ), oblasti bederních obratlů ( $p < 0,001$ ), levého (LF  $p < 0,01$ ) a pravého femuru (PF  $p < 0,001$ ) a BMD vypreparovaných femurů - femur celý (LF  $p < 0,001$ ; PF  $p < 0,01$ ), proximální část (LF  $p < 0,001$ ; PF  $p < 0,01$ ), diafýza (LF  $p < 0,05$ ; PF  $p < 0,05$ ) v porovnání s sham. Po podávání metoprololu nedošlo k statisticky významné změně BMD vs. kontrola.

Orchidektomie také zpomalila růst femurů do délky se signifikací pouze u pravého femuru ( $p < 0,01$ ), ale neovlivnila jeho mechanické vlastnosti vs. sham. Metoprolol neovlivnil denzitu kostního minerálu, délku, průměr, tloušťku kortikalis femuru a jeho mechanické vlastnosti v porovnání s kontrolou.

## **6.5 Vliv kombinace léčiv amlodipinu a atorvastatinu na kostní metabolismus u potkanů**

### **6.5.1 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 % ( $p < 0,05$ ) v séru vs. kontrola. V kostním homogenátu byl také zjištěn pokles hladiny BALP, ale bez statistické významnosti v porovnání s kontrolou.

Kombinace léků statisticky významně neovlivnila množství BMD v hodnocených oblastech a mechanické vlastnosti femuru vs. kontrola. Po 8 týdnech byl pravý femur signifikantně delší ( $p < 0,05$ ) než u kontrolní skupiny. Délka levého femuru byla též větší, ale bez požadované signifikance.

Podávání kombinace léků způsobilo nárůst hladiny BMP-2 v proximální tibiai v porovnání s kontrolní skupinou.

## 7. 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 hypercholesterolemie, 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. Proto je poslední dobou středem zájmu nových výzkumů, zda běžně předepisované léky nezasahují do kostního metabolismu. Pravděpodobně jak hypertenze, tak hypercholesterolemie 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.

### 7.1 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 $\beta$ -estradiol (Clarke a Khosla, 2009). Biologicky dostupný 17 $\beta$ -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. Vzrůst hodnot kostních markerů signalizuje zvýšení kostního obratu. V souladu s našimi výsledky byl popsán vliv ovariektomie u samic potkanů kmene Wistar na hladinu kostních markerů (Miyazaki *et al.*, 2004). Z dosavadních zjištění je zřejmé, že deficiencie gonadálních hormonů zapříčiňuje 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 zapříčinila 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).

## 7.2 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.

## 7.3 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 efekt 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, dvojité 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 statisticky významný pokles hladiny BALP po 8 týdnech podání atorvastatinu 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 následně 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 nebyly 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 provedení orchidektomií. 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 (Nellemann *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 hypercholesterolemií 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 aktuálním stavem skeletu potkana. Domníváme se, že vliv atorvastatinu na hladinu BMP-2 v kostní tkáni závisí na výchozím stavu kostního metabolismu, kdy v 1. experimentu byl nepoškozen a v 2. experimentu byl narušen vlivem provedené orchidektomie. 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 ke 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.

#### 7.4 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 nárůst 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 objevily i v práci Moraes *et al.* (2011), 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 potvrzují 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 ke 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 statisticky nevýznamné snížení BALP a nárůst 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.

## 7.5 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.

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.

## 7.6 Vliv metoprololu na kostní metabolismus u potkanů

V současnosti máme k dispozici několik studií o vlivu  $\beta$ -blokátorů na kostní metabolismus a převážná většina z nich demonstruje pozitivní vliv na skelet. Bylo zjištěno, že  $\beta$ -blokátory pravděpodobně zvyšují novotvorbu kostní hmoty (Takeda *et al.*, 2002). Mnohé práce uvádí, že užívání  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 vlivy, 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 nutně 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 znatelnému nárůstu exprese kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální části tibiae. 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 samecích 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 tibiae. Kostní morfogenetické proteiny (BMP) patří do nadrodiny růstových faktorů TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), 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 tibiai 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.

## 8. Závěry

- **Orchidektomie** provedená u potkanů kmene Wistar způsobila po 12 týdnech zvýšení kostního obratu (nárůst koncentrací – PINP, CTX-I, BALP, OPG, BMP-2), pokles 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 těž 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.



## 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 a její léčba*. Praha : Maxdorf, 2007. 135 s. ISBN 978-80-7345-134-9. Kapitola 1., Úvod, s. 11.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) CLARKE, B.L. – KHOSLA, S. Androgens and bone. *Steroids*, 2009, vol. 74, no. 3, s. 296-305.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) ERBEN R.G. Skeletal effects of androgen withdrawal. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2001, vol. 1, no. 3, s. 225-233.
- 19) 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.

- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Lee, A.J. – Hodges, S. – Eastell, R. Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2000, vol. 37, s. 432-446.
- 37) 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.
- 38) 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.

- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) MORAIN, P. – PEGLION, J.L. – GIESEN-CROUSE, E. Ca<sup>2+</sup> 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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, s. 3122-3124.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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.
- 57) Paduch, D.A. – Bolyakov, A. – Kipper, J. – Pacík, D. Osteopenie a osteoporóza u infertilních mladých mužů trpících sexuální dysfunkcí – klinická zkušenost. *Urologické Listy*, 2008, roč. 6, č. 4, s. 40-53.
- 58) 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.
- 59) 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.
- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) POOLE, K.E. – COMPSTON, J.E. Osteoporosis and its management. *British Medical Journal*, 2006, vol. 333, no. 7581, s. 1251-1256.
- 64) RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol. 115, no. 12, s. 3318-3325.
- 65) 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.
- 66) 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.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) 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.
- 70) ROSENSON, 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.
- 71) 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.
- 72) RUIZ-GASPA, S. – NOGUES, X. – ENJUANES, A. – MONLLAU, J.C. – BLANCH, J. – CARRERAS, R. – MELLIBOVSKY, L. – GRINBERG, D. – BALCELLS, S. – DÍEZ-PEREZ, 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.
- 73) RŮŽIČKOVÁ O. Opomíjený problém geriatric: osteoporóza mužů. *Česká geriatrická revue*, 2008, roč. 6, č. 2, s. 73-82.
- 74) 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.
- 75) SERTBAS, Y. – ERSOY, U. – AYTER, M. – GULTEKIN TIRTIL, 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.
- 76) SHEPHERD, J. Lipids in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 2004, vol. 32, no. Pt 6, s. 1051-1056.
- 77) 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.

- 78) 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.
- 79) 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.
- 80) 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.
- 81) 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.
- 82) 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.
- 83) 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.
- 84) 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.
- 85) TURKER, S. – KARATOSUN, V. – GUNAL, I. Beta-blockers increase bone mineral density. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2006, vol. 443, s. 73-74.
- 86) TURNER, C.H. – BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 1993, vol. 14, no. 4, s. 595-608.
- 87) 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.
- 88) URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, vol. 150, no. 3698, s. 893-899.
- 89) 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.
- 90) 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.
- 91) VAN HECK, 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.
- 92) 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.
- 93) 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.
- 94) 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.
- 95) 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.
- 96) 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.
- 97) 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.

- 
- 98) 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.
  - 99) 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.
  - 100) 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.

## 10. Přehled přednáškové a publikační činnosti

### 7.7 Původní vědecké práce s impakt faktorem

1. Gradosova, I. – Zivna, H. – Svejkovska, K. – Palicka, V. – Tichy, A. – Zivny, P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie*, 2011, vol. 66, no. 8, s. 606-610 [IF 0,869].
2. Gradosova, I. – Zivna, H. – Svejkovska, K. – Palicka, V. – Tichy, A. – Zivny, P. Effects of amlodipine on bone metabolism in male albino Wistar rats. *ACTA VETERINARIA BRNO*, 2011, vol. 80, no. 4, s. 391-396 [IF 0,534].
3. Gradosova, I. – Zivna, H. – Palicka, V. – Hubena, S. – Svejkovska, K. – Zivny, P. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 2012, vol. 679, no. 1-3, s. 144-150 [IF 2,737].
4. Gradosova, I. – Zivna, H. – Palicka, V. – Hubena, S. – Svejkovska, K. – Zivny, P. Protective effect of amlodipine on rat bone tissue after orchidectomy. *Pharmacology*, 2012, vol. 89, no. 1-2, s. 37-43 [IF 1,802].

### 7.8 Publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech

1. Gradošová, I. – Josefová, K. – Živná, H. – Živný, P. – Palička, V. Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2009, roč.14, č. 4, s. 156-160.
2. Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Živná, H. – Živný, P. – Čermáková, E. – Tichý, A. – Palička, V. Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 1, s. 3-7.
3. Gradošová, I. – Živná, H. – Živný, P. – Hubená, S. – Švejkovská, K. – Palička, V. Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, s. 4, s. 153-158.
4. Josefová, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Doubková, K. – Holeček, M. – Živný, P. Palička, V. Vliv vysokoproteínové diety se zvýšeným obsahem glutaminu na metabolismus kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2010, roč. 15, č. 1, s. 3-8.
5. Švejkovská, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Doubková, K. – Živný, P. – Čermáková, E. – Palička, V. Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 142-148.
6. Živná, H. – Živný, P. – Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Hubená, S. – Živný, O. – Palička, V. Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 137-141.
7. Živný, P. – Živná, H. – Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Hubená, S. – Palička, V. Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 149-153.
8. Živný, P. – Švejkovská, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Palička, V. Možnosti určení mechanické odolnosti kostí v experimentu - souhrn poznatků. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 131-136.

## 7.9 Původní vědecké práce v recenzním řízení

1. Zivna, H. – Maric, L. – Gradosova, I. – Svejkovska, K. – Hubena, S. – Palicka, V. – Zivny, P. The effect of mud-bath therapy on bone status in rats during adjuvant subchronic arthritis. Acta Medica, v recenzním řízení.

## 7.10 Posterová sdělení

1. Gradosova I., Josefova K, Zivna H, Zivny P, Palicka V. Effects of metoprolol on bone metabolism in male rats. IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Florencie, 5. - 8. 5. 2010. Abstrakt uveřejněn v: Osteoporos Int. 2010;21(Suppl1):60.
2. Gradosova I., Josefova K, Zivna H, Zivny P, Palicka V. Effects of amlodipine on the bone turnover in male albino wistar rats. 37th European Symposium on Calcified Tissues, Glasgow, 26. - 30. 6. 2010. Abstrakt uveřejněn v: Bone. 2010;47(Suppl1):83.
3. Gradošová I., Živná H, Hubená S, Švejkovská K, Palička V, Živný P. Vliv amlodipinu a atorvastatinu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar. X. celostátní sjezd ČESKÉ SPOLEČNOSTI KLINICKÉ BIOCHEMIE, Plzeň, 25. - 27. 9. 2011. Abstrakt uveřejněn v: Klinická biochemie a metabolismus. 2011;3:200.
4. Gradošová I., Živná H, Hubená S, Švejkovská K, Palička V, Živný P. Ochranný vliv amlodipinu na kostní tkáň u potkanů po provedené orchidektomii. XIV. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, Hradec Králové, 8. - 10. 9. 2011. Abstrakta uveřejněna v: Osteologický Bulletin. 2011;16(3):109-110.
5. Gradošová I., Živná H, Hubená S, Švejkovská K, Palička V, Živný P. Protektivní účinek atorvastatinu na kostní tkáň u kastrovaných samců potkanů kmene Wistar. XIV. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, Hradec Králové, 8. - 10. 9. 2011. Abstrakta uveřejněna v: Osteologický Bulletin. 2011;16(3):100-111.
6. Gradošová I., Živná H, Hubená S, Švejkovská K, Palička V, Živný P. Vliv metoprololu na kostní metabolismus u orchidektomovaných samců potkanů kmene Wistar. XIV. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, Hradec Králové, 8. - 10. 9. 2011. Abstrakta uveřejněna v: Osteologický Bulletin. 2011;16(3): 111.

## 7.11 Odborná přednáška

1. Fakultní konference studentů DS 2. ročníku, 24. 5. 2010, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem VLIV VYBRANÝCH LÉČIV NA KOSTNÍ METABOLISMUS U POTKANŮ.