

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Alena Jindrová

**VLIV FYZIOLOGICKY KONTROLOVANÉ MOTORIKY NA
BIOMECHANICKÉ VLASTNOSTI GEOMETRIE PRŮŘEZŮ DLOUHÝCH
KOSTÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Mgr. Vladimír Sládek, Ph.D.

PRAHA 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 26. 8. 2011

Alena Jindrová

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. Vladimíru Sládkovi Ph.D. za konzultace, metodickou a odbornou pomoc a mnoho cenných rad při psaní diplomové práce. Další poděkování patří členům našeho týmu, zejména pak Mgr. Janu Tůmovi za konzultace, pomoc s realizací experimentu a poskytnutí materiálu ze své studie. Dále děkuji Mgr. Martinu Horovi za pomoc a rady v průběhu práce. Děkuji také Mgr. Ondřeji Šebestovi za pomoc při práci s konfokálním mikroskopem a za úpravu makra pro program ImageJ. Práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, grantem č. 408911.

Obsah

Abstrakt.....	6
Úvod.....	8
Makroskopická stavba kosti.....	9
Mikroskopická stavba hutné kostní tkáně.....	9
Osteocyty jako mechanické senzory kosti	11
Remodelace kosti	11
Biomechanické vlastnosti kosti	13
Působení mechanické zátěže na kost	15
Výzkumy biomechanických parametrů v antropologii.....	17
Geometrické vlastnosti transversálního průřezu kosti (CSG)	19
Vztah CSG k mechanické zátěži.....	20
Testování faktorů ovlivňujících CSG	21
Lokální vs. systémové faktory a jejich vliv na CSG.....	22
Cíl práce.....	24
Materiál.....	25
Metody	26
Testy motorických vlastností	26
Příprava histologického preparátu	27
Zobrazení preparátu v konfokálním mikroskopu.....	28
Analýza CSG parametrů	28
Test intraobservační chyby CSG	29

Metody statistického šetření	31
Výsledky	32
Výsledky srovnání tělesných parametrů	32
Výsledky CSG holenní kosti.....	33
Diskuze	36
Závěr	44
Citovaná literatura.....	45
Přílohy: Tabulky	53
Přílohy: Grafy	58
Přílohy: Obrázky.....	69

Abstrakt

Mechanická zátěž ovlivňuje geometrické vlastnosti transversálního průřezu kosti (CSG). Cílem této diplomové práce bylo zkoumat integrálním experimentem vztah mezi lokomočními parametry a parametry geometrie průřezu dlouhých kostí a testovat tak některé dílčí poznatky o způsobu adaptace kostní tkáně na mechanickou zátěž. Experimenty probíhaly na dvou skupinách myši kmene B6CBA: (a) Lurcher typ (model olivocereberální degenerace; $n = 10$) a (b) kontrola (zdraví jedinci; $n = 10$). Na zkoumaných jedincích byly snímány motorické parametry a analyzovány geometrické charakteristiky transversálních řezů hutné kostní tkáně. Motorické testy sestávaly z vyšetření spontánní motorické aktivity (Open field), silových vlastností (hrazda) a motorické koordinace (rotarod). Transverzální řezy byly odebrány v 50 % biomechanické délky levé holenní kosti a dále zpracovány pro fluorescenční konfokální mikroskopii. Na histologických řezech jsme pomocí softwaru ImageJ sejmuli biomechanické charakteristiky geometrie hutné kostní tkáně. Mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou jsme nenašli signifikantní rozdíly v parametrech CSG (TA, CA, I_{max} , I_{min} , J, I_{max}/I_{min}). Výsledky nepotvrdili náš předpoklad o působení motorické poruchy na parametry CSG. Neprokázali jsme působení lokálních faktorů na biomechanickou adaptaci kosti. Výsledky práce mohou v antropologii přispět k novým možnostem testování parametrů hutné kostní tkáně.

Klíčová slova: mechanická zátěž, adaptace kosti, CSG, holenní kost, motorická porucha, Lurcher

Abstract

The mechanical loading affects the long bone cross-section geometry (CSG). The aim of this thesis was to examine experimentally the relationship between the locomotory parameters and cross-sectional properties of long bones, and to test some partial knowledge of the bone mechanical adaptation. Two groups of B6CBA mice were examined: (a) Lurcher type (model of olivocerebellar degeneration; n = 10) and (b) control (normal mice; n = 10). We analyzed the motor characteristics and the bone cross-sectional geometric properties. The motor tests included the test of spontaneous motor activity (Open field), strength properties (horizontal bar) and motor coordination (rotarod). Cross-sections were taken in 50 % of the left tibia biomechanical length and further processed for fluorescence confocal microscopy. We analyzed the biomechanical properties of cortical bone cross-sections (software ImageJ). There were nonsignificant differences in CSG parameters (TA, CA, I_{max} , I_{min} , J, I_{max}/I_{min}) between Lurcher and control mice. The results did not support our assumption about the effect of motor disorder on CSG properties. We did not demonstrate the effect of local factors on the bone biomechanical adaptation. The results of this thesis may be useful to find new testing possibilities of cortical bone in anthropology.

Key words: mechanical loading, bone adaptation, tibia, CSG, motor disorder, Lurcher

Úvod

Adaptace kosti je souhrnný proces zahrnující remodelaci kostní tkáně, díky které dochází ke změnám v biomechanických vlastnostech geometrie průřezů dlouhých kostí (Cowin et al., 1991). Tyto změny jsou pravděpodobně vyvolány lokálním působením mechanické zátěže na kost (Fritton et al., 2005; De Souza et al., 2005; Wilks et al., 2009; Sugiyama et al., 2010). Otázkou zůstává, do jaké míry je adaptace kosti na mechanickou zátěž ovlivněna také systémovými faktory, jako je např. hormonální, genetická a nervová regulace a věk. Předpokladem pro tuto práci je lokální působení mechanické zátěže na kost, způsobené specifickou motorikou jedince, která se může projevit v geometrických vlastnostech průřezu dlouhé kosti.

Geometrických vlastností transversálního průřezu se využívá k odhadu způsobu adaptace dlouhých kostí na mechanickou zátěž. V antropologii mohou vést výzkumy způsobu adaptace kosti na mechanickou zátěž k novým možnostem testování parametrů hutné kostní tkáně, které mohou být využity při dalších výzkumech např. v retrospektivní antropologii, bioarcheologii, archeologii a forenzní antropologii. Poznatky o adaptaci kosti na mechanickou zátěž mohou mít zásadní vliv pro výzkumy mobility a manipulativního chování minulých populací člověka, ale i dalších témat antropologie, či lékařství a evoluční biologie.

Pro testování způsobu adaptace kosti se využívají různé bioarcheologické, klinické a experimentální modely (Ruff et al., 2006). Problémem testování může být invazivita experimentu, která často nepřímo působí na fyziologické procesy organismu (Ruff et al., 2006). Proto jsme v naší práci použili neinvazivní model ovlivnění motoriky. To nám umožňuje bez předchozího invazivního zásahu sledovat vliv projevů motorické poruchy (např. nekoordinovanost pohybů, třes) na hutnou kostní tkáň.

Jako model jsme použili holenní kost dospělé mutantní myši typu Lurcher (model olivocereberální degenerace) a normální zdravé myši (kontrola) kmene B6CBA. Olivocereberální degenerace způsobuje patologické změny motorických funkcí (např. tremor, astenie, adiadochokineze, dysmetrie nebo lokomoční lateropulze). U jedinců s motorickou poruchou předpokládáme odlišné působení lokální mechanické zátěže, čímž se odliší i biomechanické charakteristiky geometrie transversálních průřezů dlouhých kostí.

Biomechanické parametry jsou odvozeny od dynamické reakce na mechanické síly a momenty, a to jak v kompresi, tak i ohybu, stříhu a torzi (Nordin and Frankel, 2001). Vliv mechanické zátěže lze vyjádřit biomechanickými parametry distribuce hutné kostní tkáně v transverzálním průřezu (Obr. 1). Na průřezu těla dlouhé kosti rozlišujeme plochu hutné kostní tkáně a dřeňovou dutinu. Biomechanické parametry sestávají z parametrů plochy průřezu (např. celková plocha průřezu, plocha hutné kostní tkáně) a z kvadratických momentů plochy průřezu (kvadratické momenty a polární kvadratický moment plochy průřezu).

Makroskopická stavba kosti

Kost je dynamický orgán, který můžeme podle tvaru, stavby, cévního zásobení, růstu a biomechanických vlastností rozdělit do tří skupin. Rozlišujeme kosti dlouhé, krátké a ploché. V naší práci jsme analyzovali holenní kost, která patří mezi dlouhé kosti končetiny. Dlouhá kost sestává u dospělého jedince z těla a z proximálního a distálního konce dlouhé kosti. Tělo dlouhé kosti má často válcovitý tvar, jehož plášť tvoří hutná kostní tkáň a dutinu vyplňuje kostní dřeň (dřeňová dutina). Konce dlouhých kostí jsou tvořeny kostní trámčinou (spongiózou), obklopenou tenkou vrstvou hutné kostní tkáně. Na longitudinálním řezu dlouhou kostí rozlišujeme hutnou a spongiózní kostní tkáň. Hutná kostní tkáň tvoří povrch všech kostí a největší tloušťky dosahuje v těle dlouhých kostí. Spongiózní kostní tkáň je složena z trámců, trabekul, které se kříží a rozvětvují na způsob houbovité struktury. Mezi trámci zůstávají dutinky vyplněné kostní dřeví. Uspořádání struktury hutné a spongiózní kostní tkáně může vypovídat o působení mechanických sil na kost. Povrch dlouhé kosti je na zevní ploše pokryt periostem a na vnitřní endostem. Periost je specializovaná, vysoce vaskularizovaná membrána, pokrývající většinu vnějšího povrchu kosti. Je složena ze dvou vrstev. Vnější vrstvu tvoří kolagenní vlákna a fibroblasty. Vnitřní vrstva obsahuje kostní buňky v různých stádiích diference.

Mikroskopická stavba hutné kostní tkáně

Na mikroskopické úrovni sestává kostní tkáň z buněk a mezibuněčné hmoty (kostní matrix). Kostní buňky produkují mezibuněčnou hmotu, která nad nimi svým objemem převažuje. Mezibuněčná hmota sestává z organické a anorganické matrix. Organickou matrix tvoří z 98 % kolagenní vlákna. Anorganická matrix je tvořena ukládáním vápníku a fosfátových solí ve formě hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$) (Nordin and Frankel, 2001). Vápník a fosfor podmiňuje pevnost a tvrdost kosti, kolagenní vlákna pružnost. Kost je

největší zásobárnou vápníku v těle. Kromě vápníku jsou zde ukládány další minerály jako fosfor, sodík, draslík, zinek a hořčík. Vápník je důležitý pro chod mnoha vitálních metabolických procesů. Udržení minerální rovnováhy v těle svou důležitostí převažuje nad udržením pevnosti kosti dostatečným ukládáním vápníku. Rovnováha minerálů je regulována hormony: parathyroidní hormon (PTH), kalcitonin (CT), cholekalciferol (vitamín D), pohlavní hormony a růstové hormony (Nordin and Frankel, 2001).

V kostní tkáni se nacházejí tři základní typy buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty (Cooper and Milgram, 1966). Osteoblasty produkují organické komponenty kostní matrix a nacházejí se na vnitřním i vnějším povrchu kosti a také ve stěnách kanálků (Hillsley and Frangos, 1993). Na přítomnosti osteoblastů je závislé ukládání anorganických látek do kostní matrix. Osteoblasty se již dále nedělí. Osteocyty jsou plně diferencované osteoblasty, které jsou zcela zalaty v kostní matrix. Jsou uloženy v lakunách a výběžky umístěnými v kanálcích komunikují s ostatními osteocyty, nebo osteoblasty (Cooper and Milgram, 1966). V místě, kde se dotýkají výběžky dvou sousedních kostních buněk, jsou mezibuněčné spoje. Mezibuněčné spoje umožňují iontům a prvkům s nízkou molekulovou hmotností prostoupit z jedné buňky do druhé, aniž by se dostali do extracelulárního prostoru (Cowin, 2002). Mezibuněčné spoje umožňují propojení osteocytů s endostálními a periostálními lemovými buňkami a s osteoblasty (Cowin, 2002). Osteoklasty jsou volné buňky kostní tkáně a jejich funkcí je kostní matrix odbourávat. Jsou to velké pohyblivé buňky s četnými výběžky, uložené na povrchu kostní tkáně v drobných prohlubních.

Architektura hutné kostní tkáně má tři stupně porozity. Vaskulární porozitu, lakuno-kanalikulární porozitu a kolagen-apatitovou porozitu mineralizované matrix. Vaskulární porozita kosti je u živočichů bez sekundárních osteonů (např. myši a krysy) tvořena primárními a transverzálními kanálky (Ciani et al., 2005). Tato porozita je ze všech tří výše jmenovaných největší (20 μm) (Cooper and Milgram, 1966). Lakuno-kanalikulární porozita je tvořena prostorem okolo osteocytů v lakunách a kanálcích (Obr. 2). Nejmenší kostní porozitou je kolagen-apatitová porozita, kterou vytváří prostor mezi kolagenovými vlákny a krystalky minerálního apatitu (Ciani et al., 2005). Vaskulární a lakuno-kanalikulární porozita jsou přímo zahrnuty do procesu proudění intersticiální tekutiny, které zřejmě hraje důležitou roli v kostní přestavbě (Cowin et al., 1991; Hillsley and Frangos, 1993; Dodd et al., 1999; Knothe-Tate and Knothe, 2000).

Osteocyty jako mechanické senzory kosti

Osteocyty uložené v lakuno-kanalikulární systému jsou považovány za mechanické senzory kosti (Cowin et al., 1991). Osteocyty tvoří 90-95 % celkového počtu buněk kosti a jsou většinou pravidelně rozprostřeny v mineralizované matrix, zejména v hutné kostní tkáni. Buňky naléhají na okolní matrix speciálními receptory v cytoplazmatické membráně (integriny a CD44 receptory) a díky těmto receptorům se zřejmě přenáší mechanický stimul na intracelulární signál (Wang et al., 1993; Klein-Nulend et al., 2003). Mechanická zátěž způsobená změnou motorických funkcí vyvolává deformaci perilakunární kostní matrix a proudění tekutiny v lakuno-kanalikulárním systému (Cowin et al., 1991; Piekarski and Munro, 1997; Cowin, 2002; Nicoletta et al., 2006). Tento jev byl také prokázán experimentálně pomocí značených látek (Knothe-Tate and Knothe, 2000; Mak et al., 2000; Wang et al., 2005).

Proudění tekutiny lakuno-kanalikulárním systémem vede ke vzniku stříhového tlaku tekutiny na buněčnou membránu osteocytu (Cowin et al., 1991). Odpovědí osteocytu na stříhový tlak tekutiny je produkce rozpustných faktorů (např. prostaglandiny a NO), které regulují aktivitu osteoklastů a osteoblastů, vedoucích k remodelaci hutné kostní tkáně (Klein-Nulend et al., 2003). Hydrostatický tlak, který vznikne v lakuno-kanalikulární porozitě vlivem mechanické zátěže je přibližně čtyřicetkrát vyšší, než tlak v porozitě vaskulární (Zhang et al., 1998).

Remodelace kosti

Ke změnám morfologie dlouhých kostí dochází díky remodelaci kostní tkáně (Cowin et al., 1991). Remodelaci kostní tkáně lze rozdělit na proces modelace a remodelace. Modelace kosti je proces, ve kterém převažuje tvorba kostní tkáně nad odbouráváním kosti, dochází tedy ke zvětšování množství kostní hmoty (Nigg and Herzog, 2006). Remodelace je proces, kterým se množství kostní hmoty udržuje, nebo zmenšuje (Nigg and Herzog, 2006).

Proces modelace se odehrává na vnitřním i vnějším povrchu kosti (endokortikálně a periostálně) a může měnit tvar kosti. Modelace převládá v dětském věku do ukončení maturace kostní tkáně, v dospělosti se vyskytuje méně. Proces remodelace zahrnuje všechny procesy odehrávající se v hutné kostní tkáni (intrakortikálně). Synonymem pro remodelaci kosti je mechanická adaptace kosti. Remodelace udržuje množství kostní

hmoty a integrity kosti odstraňováním mikroskopických trhlin, které vznikají během normální fyzické zátěže (Nigg and Herzog, 2006). Mechanismus, který reguluje remodelaci není úplně znám. Předpokládá se, že osteocyty fungují jako mechanosenzory kostní tkáně, které regulují proces remodelace (Cowin et al., 1991; Nigg and Herzog, 2006). Regulační proces remodelace byl popsán v teorii mechanostatu (Frost, 1987). Frost ve své práci popisuje, jak a kdy dochází k (re)modelaci v závislosti na deformačním prostředí. Teorie předpokládá přítomnost fyziologického okna pro normální deformaci. Když dosáhne deformace nižších hodnot ($< 200 \mu\epsilon$), vyvolá proces remodelace, pokud překročí horní limit ($2500 \mu\epsilon$ pro kompresi, $1500 \mu\epsilon$ pro tenzi) vyvolá modelaci kosti (Frost, 1987). Otázkou zůstává, jaký typ zátěže je vnímán kostí a způsobí proces remodelace.

Biomechanické vlastnosti kosti

Při analýze kostní morfologie vycházíme z biomechanických vlastností kosti. Strukturální vlastnosti kosti souvisí s celkovou organizací hutné kostní tkáně a kostní trámčiny. Materiálové vlastnosti souvisí se složením vlastní kostní hmoty (Nigg and Herzog, 2006). Z biomechanického hlediska lze kost považovat za dvousložkový materiál, obsahující složku minerální a vláknitou (Nordin and Frankel, 2001). Minerální složka zajišťuje pevnost kosti, vláknitá potom pružnost. Oba tyto parametry jsou z funkčního hlediska nejdůležitějšími biomechanickými vlastnostmi kosti (Nordin and Frankel, 2001).

Pevnost a pružnost kosti mohou být měřeny přímo aplikovanými biomechanickými testovacími metodami, včetně testu v kompresi a tahu, nebo testu ve tří/čtyř bodovém ohybu (Nigg and Herzog, 2006). Pokud bychom na těleso aplikovali zátěž ve známém směru, můžeme měřit deformaci materiálu a vynést hodnoty na deformační křivku. Z deformační křivky lze získat informace o pevnosti, pružnosti a dalších mechanických vlastnostech zkoumaného tělesa (Nordin and Frankel, 2001). Deformační křivka pro vláknité těleso, jakou je kost (Obr. 3), sestává z přímočaré části znázorňující elastickou deformaci. Elastická deformace vyjadřuje schopnost tělesa vrátit se do svého původního stavu po skončení působení deformační síly (Nordin and Frankel, 2001). Tato část křivky končí bodem, který nazýváme „mez úměrnosti“ (U). Mez úměrnosti udává limit elastické deformace (Nordin and Frankel, 2001). Po překročení meze úměrnosti nastává plastická deformace materiálu. Při působení plastické deformace již nedochází k návratu tělesa do původního stavu, materiál zůstává deformovaný (Nordin and Frankel, 2001). Křivka plastické deformace končí tzv. bodem přetržení (X), v tomto bodě dochází např. ke zlomení kosti (Nordin and Frankel, 2001).

Pevnost kosti může být determinována třemi parametry deformační křivky:

- 1) Zatížení, kterému může být těleso vystaveno do bodu přetržení;
- 2) Deformace, které může být těleso vystaveno do bodu přetržení;
- 3) Energie, kterou může těleso přijmout do bodu přetržení.

Pevnost je z hlediska zatížení a deformace charakterizována na křivce bodem přetržení (Nordin and Frankel, 2001). Pevnost je z hlediska příjmu energie charakterizována velikostí plochy pod křivkou (Nordin and Frankel, 2001). Čím je plocha

větší, tím přijímá těleso během zátěže větší energii (Nordin and Frankel, 2001). Pružnost tělesa je dána sklonem (strmostí) křivky v oblasti elastické deformace (Nordin and Frankel, 2001). Čím je křivka elastické deformace strmější, tím je materiál pružnější (Nordin and Frankel, 2001).

Deformační křivka je vhodná ke stanovení mechanických vlastností celého tělesa, např. celé kosti. Ke stanovení vlastnosti materiálu, ze kterého je těleso složeno (např. kostní tkáň), je potřeba standardizovaných podmínek testu, musí být dána velikost a tvar testovaných vzorků (Nordin and Frankel, 2001). Používá se přesných měrných jednotek, jako jsou: jednotka zátěže aplikovaná na plochu vzorku (σ ; napětí – *stress*) a velikost deformace z hlediska procent změn v rozměrech vzorku (ϵ ; deformace – *strain*). Křivka se potom označuje jako napětově-deformační – „*stress-strain*“ křivka (Nordin and Frankel, 2001). Mezi nejčastěji používané jednotky při výpočtu napětí patří N/mm^2 , N/cm^2 , Pa. Deformaci lze rozdělit na lineární deformaci, která způsobuje změnu v délce vzorku ($\epsilon = \Delta L / L$; bezrozměrná veličina), a stříhovou deformaci, která způsobuje změny úhlových vztahů ve vzorku ($\gamma = \pi / 2 - \alpha$, vyjádřeno v radiánech) (Nordin and Frankel, 2001).

Hodnoty napětí (σ) a deformace (ϵ) kostní tkáně mohou být získány testováním standardizovaného vzorku v zátěži. Vynesením těchto hodnot získáme napětově-deformační křivku. Oblasti napětově-deformační křivky jsou stejné jako u deformační křivky. Pružnost kostní tkáně je dána poměrem hodnot pro napětí a deformaci v daném bodě křivky ($E = \sigma / \epsilon$) (Nordin and Frankel, 2001). Tato hodnota se nazývá Youngův modul pružnosti.

Fyziologické zatížení kosti probíhá v elastickém pásmu (Nigg and Herzog, 2006). Proto můžeme dle základních analytických metod pro mechaniku materiálu, odhadnout hodnotu napětí pro danou konfiguraci zátěže. Zátěž může být axiální, v ohybu, v torzi a transverzální. Pro zjednodušení testování se s kostní tkání často pracuje jako s homogenním, izotropním materiálem (Nigg and Herzog, 2006).

Anizotropie a nehomogenita kosti

Kost je často pro zjednodušení považována za izotropní a homogenní tkáň. Ve skutečnosti je však kostní tkáň anizotropní a nehomogenní (Nigg and Herzog, 2006).

Mechanické vlastnosti mohou být pro výpočetní účely zjednodušeny v závislosti na potřebné úrovni komplexity k vyřešení daného problému (Nigg and Herzog, 2006).

Nehomogenita kosti znamená, že materiálové vlastnosti kostní tkáně jsou odlišné v prostoru, kost se tedy v různých částech liší (Nigg and Herzog, 2006). Na úrovni tkáně se může hutná kostní tkáň lišit ve stupni mineralizace, nebo v porositě (Nigg and Herzog, 2006). Rozdíly v kostní trámčině mohou být způsobeny různým stupněm mineralizace a také uspořádáním trámčů (Nigg and Herzog, 2006). S nehomogenitou kostní tkáně se často nepočítá díky nedostatku potřebných informací. Tento problém může být vyřešen využitím lepších trojrozměrných zobrazovacích metod, které poskytují informace např. o kostní denzitě a mikrostruktuře kosti.

Působení mechanické zátěže na kost

Základem všech pokusů o rekonstrukci chování z morfologie kosti je předpoklad, že se kost v průběhu života adaptuje na své mechanické prostředí. Pokud by se kost na mechanickou zátěž neadaptovala, pak by její morfologie nevypovídala o zátěži, které byla kost vystavena, a nebylo by možné odvodit chování, které tuto zátěž způsobilo (Ruff, 2007).

Vztah mezi mechanickou zátěží a morfologií skeletu byl identifikován již před mnoha lety. Galileo (1638) byl jedním z prvních, kdo se tímto vztahem zabýval. V roce 1892 byl zformulován „zákon kostní remodelace“, popisující vztah mezi strukturou kosti a mechanickou zátěží, dnes znám jako tzv. „Wolffův zákon“. Julius Wolff ve své práci popsal specifickou orientaci trámčů v proximální části femuru, které jsou uspořádány ve směru výslednice různých mechanických sil působících na kost a lze je odvodit matematickými vzorci (Wolff, 1892). Nejde však o zákon v matematickém slova smyslu. Zhruba ve stejné době popsal Vilhelm Roux (1881) adaptaci kosti jako následek kvantitativního seberegulačního mechanismu. Dle Rouxe je struktura a funkční adaptace architektury trabekulární kosti regulována lokálně buňkami a řízena mechanickým stimulem, jako součást seberegulačního procesu (Huiskes, 2000).

Dnes je však vztah mezi mechanickou zátěží a strukturou kosti považován za mnohem komplexnější (Pearson and Lieberman, 2004). Wolffův zákon je založen na chybném předpokladu (Bertram and Swartz, 1991), že kost je homogenní a izotropní struktura, na kterou působí statické síly (Ruff et al., 2006). Wolffův zákon například

nepočítá s rozdílem mezi statickou a dynamickou zátěží, které mají rozdílný vliv na remodelaci kosti (Lanyon and Rubin, 1984). K popisu vztahu mezi mechanickou zátěží a strukturou kosti by proto měl být termín „Wolffův zákon“ raději nahrazen termínem „funkční adaptace kosti“ (Ruff et al., 2006). Model jednoduché zpětné vazby znázorňující funkční adaptaci kosti je popsán na Obr. 4. Model je založen na vztahu mezi deformací kostní tkáně a mechanickou zátěží. Zvýšení deformace, způsobené např. větší velikostí těla, nebo svalovou aktivitou, stimuluje novotvorbu kostní tkáně, což vede k posílení kosti a redukci velikosti deformace na původní úroveň (Ruff, 2007). Snížení deformace, způsobené např. pobytem ve stavu bez tíže, ochrnutím, nebo inaktivitou, vede k odbourávání kosti, které oslabí kost a znovu obnoví původní hodnoty deformace (Ruff, 2007). Tento základní model je podpořen mnoha experimentálními studiemi, současně má ale také mnoho omezení (Pearson and Lieberman, 2004; Lieberman et al., 2004; Ruff et al., 2006). Optimální obvyklá úroveň deformace kosti se liší v závislosti na anatomickém umístění a systémových faktorech, jako jsou např. strava, zdravotní stav, věk, hormonální a genetické faktory (Ruff, 2007). Je tedy důležité tyto faktory zohlednit při interpretaci strukturálních vlastností kosti. Kost je například normálně odbourávána s přibývajícím věkem v dospělosti, proto by měl být tento faktor zohledněn např. při porovnávání kosterních ostatků jedinců, nebo populací s rozdílným věkem úmrtí (Ruff, 2007). Vždy by se mělo myslet na to, že morfologie kosti je v jistém smyslu modifikována kompromisem mezi mechanickými a ostatními faktory (Ruff et al., 2006).

Proces funkční adaptace kosti zahrnuje nejen (re)modelaci kostní trámčiny, ale i (re)modelaci hutné kostní tkáně. Na kost také působí tah svalů, které se zde pomocí šlach a vazů upínají, nebo růst okolních orgánů (Pearson and Lieberman, 2004). Síly, kterým je kost vystavena, jsou tedy jak vnitřní (svaly), tak vnější. Struktura a architektura hutné kostní tkáně a kostní trámčiny je modifikována k maximální odolnosti s využitím minimálního množství kostní hmoty (Nigg and Herzog, 2006). Hutná kostní tkáň může reagovat na změny v působení mechanické zátěže několika způsoby, například nárůstem kostní hmoty, změnou geometrických vlastností kosti (Pearson and Lieberman, 2004), nebo přestavbou struktury kostní tkáně (Heřt et al., 1994; Petrtýl et al., 1999).

Bylo prokázáno, že se těla dlouhých kostí při mechanickém zatížení chovají podobně jako nosníky ve strojírenství (Huiskes, 1982), lze tedy využívat stejných zákonitostí a teorií, které při projektování aplikují inženýři. Pokud bychom si dlouhou kost

představili jako mechanicky namáhaný nosník, mohli bychom tvar kosti přirovnat k tyči s pláštěm a dutinou. U takového tělesa jsou pro odolnost vůči mechanickým silám důležité parametry jako např. délka, rozložení hmoty kolem neutrální osy, množství a struktura hmoty, atd. K důležitým veličinám patří napětí (σ ; definováno jako síla, F působící na jednotku plochy, S) a deformace (ϵ ; definována jako změna délky, ΔL na jednotku délky, L). Síly vytváří napětí o různé intenzitě, a to způsobuje deformaci materiálu různé velikosti a typu. Pro model nosníku může být napětí, způsobené zevně aplikovanou zátěží, vypočítáno pomocí geometrických vlastností transverzálního průřezu (CSG) (Ruff, 2007). Napětí může být vyvoláno tahem (prodloužení) nebo kompresí (zkrácení).

Kost je však často vystavena působení různých kombinací mechanických sil (Pearson and Lieberman, 2004). Kost je namáhána nejen v tahu a kompresi, ale i v torzi, ohybu a stříhu (Nordin and Frankel, 2001) (Obr. 5). K modifikaci kosti a strukturální adaptaci dochází na základě působení převažujících mechanických sil, které jsou dány specifickou lokomoční zátěží jedince.

Výzkumy biomechanických parametrů v antropologii

Ke sledování změn v morfologii kostry minulých a recentních populací se v antropologii využívá biomechanického modelu kosti, zejména jeho geometrických vlastností (Larsen, 1999). Při analýze CSG se užívá fyzikálních principů (viz výše), které jsou aplikovány na biologický materiál (biomechanika), respektive na kostní tkáň (Larsen, 1999). Biomechanika je na rozdíl od klasické mechaniky vztažena k dynamické tkáni, která se může průběžně modifikovat dle způsobu a velikosti zátěže (Larsen, 1999).

Geometrických vlastností transverzálního průřezu (CSG) se využívá k odhadu způsobu adaptace dlouhých kostí na mechanickou zátěž (Lieberman et al., 2004). V antropologii jsou k analýze biomechanických vlastností CSG často využívány transverzální průřezy těl dlouhých kostí (Sládek et al., 2006 a, 2006 b, 2007). CSG parametry jsou snímány pomocí různých metod. Ve většině případů musí být k získání CSG parametrů využita neinvazivní metoda (např. počítačová tomografie – CT, μ CT, pQCT; magnetická rezonance – MR, nebo kombinace rentgenových snímků s přímým měřením). Také data z vyšetření kostní denzitometrie (v klinické praxi běžně používaného vyšetření) mohou poskytnout informace o CSG. Vlastností CSG je v antropologii využíváno i k experimentálním výzkumům adaptace dlouhé kosti na mechanickou zátěž (Mikic et al., 1995; Bentolila et al., 1998; Lieberman et al., 2004; De Souza et al., 2005;

Sample et al., 2008). Pro testování způsobu adaptace kosti se využívají různé experimentální modely (Ruff et al., 2006). U většiny experimentálních modelů jsou transverzální řezy dlouhé kosti odebírány invazivně.

Vlastností CSG může být využito k zodpovězení velkého množství otázek týkajících se adaptačních procesů kosti člověka, např. evoluce lokomočního chování, změny ve struktuře kosti během růstu a vývoje, nebo vliv strategie obživy na chování atd. (Ruff and Hayes, 1983; Ruff et al., 1984, 1993, 1994; Trinkaus et al., 1999, 2002; Sládek et al., 2006 a, 2006 b, 2007). Velkou pozornost věnují antropologové projevům chování vycházejících z konkrétní strategie obživy minulých populací. Z tohoto hlediska se výzkumy biomechanických vlastností kostí soustředí na charakteristické skupiny, jako jsou lovci-sběrači, pastevcí, nebo zemědělci. Během evoluce člověka byly změny chování, vycházející ze strategie obživy, zřejmě důležitým faktorem ovlivňujícím dlouhodobé změny ve struktuře těl dlouhých kostí (Ruff, 2007). Důkaz o vztahu mezi strategií obživy, prostředím a strukturou dlouhé kosti existuje také u současných populací, ačkoli je tento vztah často komplexnější (Ruff, 2007). Studie archeologického materiálu z pobřeží Georgie (USA) demonstruje pokles relativní pevnosti femuru a humeru u zemědělských skupin ve srovnání se skupinami sběračů, což bylo interpretováno jako následek větší usedlosti a snížené zátěže v zemědělství (Ruff et al., 1984) (Obr. 6). Přejít k zemědělství byl tedy spojen se změnami v chování. Jiné studie původních severoamerických obyvatel ale přinesly rozdílné výsledky (Bridges, 1989). Meta-analýza u několika severoamerických skupin neukázala žádný signifikantní vliv strategie obživy na robusticitu femuru (Ruff, 2007).

Ve stejné meta-analýze byla ale prokázána silná závislost mezi obývaným terénem a robusticitou femuru (Ruff, 2007). Skupiny z horských oblastí měly větší robusticitu femuru než skupiny obývající roviny a pobřežní oblasti (Ruff, 2007). Vliv obývaného terénu na morfologii kosti je jedním z dalších zaměření biomechanických analýz CSG.

Studie zaměřené na oboustrannou (pravo-levou) asymetrii dlouhých kostí poskytují důležitý důkaz o existenci obecných mechanismů funkční adaptace kosti, stejně jako specifických behaviorálních charakteristikách minulých populací (Roy et al., 1994; Ruff et al., 1994; Sládek et al., 2007). U tohoto modelu vycházíme z předpokladu, že k adaptaci kosti dochází působením lokální mechanické zátěže. Tento obecný model je podpořen mnoha studiemi, zvláště pak těmi, které srovnávají sportovce s asymetrickou zátěží horní

končetiny (Ruff et al., 2006), např. tenisty. Tenisté mají průměrnou asymetrii těla humeru okolo 40 %, což je spojeno s velkou asymetrickou zátěží horní končetiny (Ruff et al., 2006). Asymetrie těla humeru populací svrchního paleolitu a neandrtálců je podobná jako u tenistů, což také naznačuje silnou asymetrii v zatížení horní končetiny, jako výsledek stereotypního používání nástrojů, např. kopí (Schmitt et al., 2003). Ve studii Sládek et al. (2007) srovnávající asymetrii humeru u středoevropských populací pozdního eneolitu a svrchní doby bronzové, nebyl prokázán rozdíl mezi jedinci obou období. Ukázaly se ale rozdíly v asymetrii humeru mezi muži a ženami, což je vysvětlováno specifickými charakteristikami zátěže; muži jsou spojováni s prací v zemědělství, vedoucí k asymetrické zátěži a ženy s prací v domácnosti, vedoucí k symetrické zátěži u obou období (Sládek et al., 2007).

Dalším tématem biomechanických analýz jsou pohlavní rozdíly v morfologii průřezu dlouhé kosti. Některé rozdíly v kostní struktuře mezi muži a ženami se přičítají rozdílům v mechanické zátěži. Muži mají například téměř u všech populací robustnější kosti horní končetiny, i když se mohou v souvislosti s konkrétními vzorci chování objevit odlišnosti (Ruff, 2007). Například ženy ze skupiny původní jihozápadní americké populace mají nepatrně silnější humerus než muži (standardizováno k velikosti těla), což je pravděpodobně způsobeno jejich náročným životním stylem (Weiss, 2003).

Geometrické vlastnosti transverzálního průřezu kosti (CSG)

Vlastnosti CSG vypovídají o množství a rozložení kostní hmoty v transverzálním průřezu kosti (Larsen, 1999). Při analýze CSG vycházíme z předpokladu, že mechanické síly působící na kost vyvolávají změny v biomechanických parametrech distribuce hutné kostní tkáně průřezu (Cowin et al., 1991). Vlastností CSG lze tedy využít k odhadu způsobu adaptace na mechanickou zátěž (Lieberman et al., 2004).

Již v embryonálním období získává kost vlivem dědičnosti vývojových procesů svůj základní tvar. Tento tvar pak může být (re)modelován ve své vnitřní struktuře i ve vnějším tvaru během celého prenatálního i postnatálního růstového období. K porozumění morfologie dlouhé kosti v kontextu jejího mechanického prostředí se využívá biomechanického modelu kosti. V transverzálním průřezu kosti, kolmém na její dlouhou osu, je velikost mechanického zatížení úměrná vzdálenosti od neutrální osy. Na transverzálním řezu rozlišujeme plochu, kterou zaujímá hutná kostní tkáň (*cortical area* – CA) a dřevnou dutinu (*medullary area* – MA) (Obr. 1). Plocha hutné kostní tkáně je na

řezu ohraničena pomyslnou periostální a endostální hranicí. Celková plocha kosti (*total area* – TA) zahrnuje jak plochu hutné kostní tkáně, tak dřevnou dutinu. Hutná kostní tkáň je na řezu distribuována v závislosti na působení převažující mechanické zátěže. Mechanická zátěž je tedy hlavním faktorem, který může ovlivnit vlastnosti CSG.

Mezi další faktory, které mohou ovlivnit vlastnosti CSG, patří např. délka kosti a hmotnost jedince. Na delší kost působí větší ohybový moment (Nordin and Frankel, 2001). Pozitivní korelace byla zjištěna také mezi množstvím kostní hmoty a tělesnou hmotností. Větší tělesná hmotnost je spojena s větším množstvím kostní hmoty (Exner and Prader, 1979). Z tohoto důvodu, jsou geometrické vlastnosti kosti závislé také na pohlaví jedince (Bouxsein and Karasik, 2006). Muži mají většinou větší tělesnou hmotnost a výšku než ženy, kostra je tedy vystavena větší zátěži při normální aktivitě. Velikost těla vytváří sama o sobě mechanickou zátěž (odolnost kostry na gravitaci) a je spojena s dalšími faktory, které také ovlivňují mechanickou zátěž, např. velikost svalů (Ruff, 2007). „Robusticita kostry“ může být definována jako „tuhost struktury vztažená k mechanicky relevantním hodnotám velikosti těla“ (Ruff et al., 1993). Pro analýzu CSG je proto vhodná standardizace parametrů na tělesnou hmotnost, anebo standardizace na tělesnou hmotnost násobenou biomechanickou délkou kosti (Ruff, 2007).

Vztah CSG k mechanické zátěži

Vliv mechanické zátěže nejlépe vyjádříme biomechanickými parametry distribuce hutné kostní tkáně v transverzálním průřezu. Biomechanické parametry jsou odvozeny od dynamické reakce na mechanické síly a momenty, jsou ovlivňovány druhem zátěže působícího na kost, směrem působících sil a frekvencí zátěže (Nordin and Frankel, 2001). Mezi nejčastěji počítané geometrické parametry patří celková plocha průřezu (*total area* – TA), která zahrnuje plochu hutné kostní tkáně a plochu dřevné dutiny. Dále plocha hutné kostní tkáně (*cortical area* – CA), vyjadřující odolnost kosti v axiální kompresi. Čím větší je plocha hutné kostní tkáně transverzálního řezu kosti, tím je kost pevnější a odolnější v kompresi (Nordin and Frankel, 2001). Z hodnot TA a CA lze odhadnout axiální robusticitu kosti.

Mezi další parametry CSG patří parametry vyjadřující odolnost kosti v ohybu a torzi. Pro zjištění odolnosti kosti v ohybu, jsou důležité tři faktory: 1) Celková plocha průřezu (TA) a 2) Distribuce kostní hmoty kolem neutrální osy (Nordin and Frankel, 2001). Veličina, která zahrnuje tyto dva faktory, se nazývá kvadratické momenty plochy

průřezu (*second moments of area – I*). Čím větší je I , tím je kost odolnější v ohybu (Nordin and Frankel, 2001). 3) Třetím faktorem ovlivňujícím odolnost kosti v ohybu je délka kosti. Na delší kost působí větší ohybový moment (Nordin and Frankel, 2001). U dlouhých kostí je proto rozhodující jejich tubulární tvar, který umožňuje odolávat ohybovým silám ve všech směrech. Dlouhé kosti mají větší hodnotu I , protože mají kostní hmotu rozmístěnou ve větší vzdálenosti od neutrální osy. V neutrální rovině (ohyb), nebo neutrální ose (torze) nepůsobí na kost žádné síly a napětí (Larsen, 1999). Velikost působících sil je úměrná vzdálenosti od neutrální osy průřezu kosti. Čím jsou působící síly dále od neutrální osy, tím jsou větší. Protože kost je asymetrická, nejsou síly rovnoměrně rozloženy. Oblast kosti s největšími hodnotami I označujeme jako I_{\max} , oblast s nejnižšími hodnotami potom I_{\min} . Tyto dvě veličiny charakterizují vliv působení mechanické zátěže na kost a adaptaci kosti na lokomoci jedince (Lieberman et al., 2004). Poměr těchto dvou veličin (I_{\max}/I_{\min}) udává cirkularitu průřezu (index cirkularity). Čím více se hodnota blíží 1, tím je průřez cirkulárnější.

Faktory, které ovlivňují odolnost kosti v torzi, jsou stejné jako u ohybu: TA a distribuce kostní hmoty okolo neutrální osy. Veličina, která zahrnuje tyto dva faktory při působení torze, se nazývá polární kvadratický moment plochy průřezu (*polar moment of area – J*). Čím větší je J , tím je kost odolnější v torzi. Z hodnot J lze odhadnout celkovou robusticitu kosti. Dle Liebermana et al. (2004) je J nejlepším parametrem k analýze dlouhé kosti, v případě že nemáme experimentální data o zátěži končetiny.

Testování faktorů ovlivňujících CSG

Pro výzkum adaptace kosti na mechanickou zátěž se mohou provádět klinické, experimentální, nebo bioarcheologické studie. V experimentálních studiích využívají vědci různých animálních modelů (Bentolila et al., 1998; Robling et al., 2002; Fritton et al., 2005; De Souza et al., 2005; Zhang et al., 2007; Sample et al., 2008). Problémem při výzkumu může být ale samotný způsob provedení experimentu (Bertram and Swartz, 1991), při kterém může často nepřímo dojít k narušení fyziologických procesů zkoumaného jedince. Jednou z komplikací, kterou ve své práci popisují Bertram a Swartz (1991), může být např. zánět, nebo reparační mechanismy spojené s následky chirurgicky aplikované zátěže. Také při neinvazivním způsobu provedení experimentu, kdy je zátěž aplikována nechirurgicky, např. mechanickým zatížením končetiny jedince (Bentolila et al., 1998; Robling et al., 2002), může samotná nefyziologická zátěž způsobit poškození

kosti mikrotrhlinami a tím navodit změny v adaptaci kosti. Následkem těchto adaptačních změn může dojít i k ovlivnění geometrických vlastností kosti (např. nárůstu kostní hmoty).

U klinických výzkumů recentních populací se vlastností CSG využívá např. k odhadu vlivu specifické aktivity (Haapasalo et al., 1996; Wilks et al., 2009; Rittweger et al., 2010), či vlivu systémových faktorů jako např. věk, pohlaví, hormonální stav a genetické faktory (Rauch et al., 1999; Bouxsein and Karasik, 2006; Sone et al., 2006; Tommasini et al., 2007; Wetzsteon et al., 2009) na morfologii dlouhé kosti jedince. Testování adaptace na mechanickou zátěž se u člověka nejčastěji provádí na jedincích se zvýšenou aktivitou, např. u sportovců (Sone et al., 2006; Wilks et al., 2009), či na jedincích s aktivitou sníženou, např. po ochrnutí končetin (Rittweger et al., 2010). Tyto studie jsou neinvazivního charakteru. Bertram a Swartz (1991) připisují změny v rozměrech kosti pozorovaných u sportovců spíše reparačním procesům, které jsou způsobeny chronickým únavovým postižením. Otázkou zůstává, zda jsou tyto reparační procesy ještě součástí „normálních“ adaptačních mechanismů kosti.

Lokální vs. systémové faktory a jejich vliv na CSG

Jak již bylo zdůrazněno, při analýze CSG vycházíme z předpokladu, že k adaptaci kosti dochází působením lokální mechanické zátěže (působení sil a momentů). Některé studie ale upozorňují na nejasnosti mezi působením systémových a lokálních faktorů způsobujících změny kostní remodelace. Ve prospěch systémových faktorů svědčí např. studie, ve které se následkem experimentální zátěže objevil nárůst hutné kostní tkáně na kostech lebky, která nebyla lokomocí jedince přímo zatížena (Lieberman, 1996). Na druhé straně ale existuje mnoho dalších klinických, experimentálních a bioarcheologických studií, které působení lokálních faktorů podporují (Haapasalo et al., 1996; Larsen, 1999; De Souza et al., 2005; Zhang et al., 2007; Wilks et al., 2009).

Předpoklad, že geometrické vlastnosti vypovídají o mechanické zátěži působící na kost, byl podpořen např. ve studii srovnávající vlastnosti CSG sprinterů, běžců na střední a dlouhé tratě, chodců a kontrolní skupiny nespportujících jedinců (Wilks et al., 2009). Výsledky byly v této studii v souladu s předpokladem, že vlastnosti CSG holenní kosti souvisí s rychlostí pohybu, což by mohlo být způsobeno rozdílnými silami působícími na pohybový aparát (Wilks et al., 2009).

Ačkoli je předpoklad funkční adaptace kosti podporován i řadou experimentálních výzkumů (Lanyon and Baggott, 1976; Robling et al., 2002), není vztah mezi funkční adaptací kosti a CSG bez komplikací (Lieberman et al., 2003, 2004). Využití CSG k odhadu mechanické zátěže a odhadu chování minulých populací, kde má tvar transversálního průřezu vypovídat o běžné aktivitě, může být poněkud sporné. Diskuze k těmto otázkám jsou shrnuty v některých recentních pracích (Pearson and Lieberman, 2004; Ruff et al., 2006). Platnost vztahu mezi funkční adaptací kosti a vlastnostmi CSG je v některých pracích zpochybněna. Zejména vztah mezi experimentální deformací dlouhé kosti *in vivo*, z toho plynoucích vlastností CSG a jejich interpretace (Demes et al., 2001; Lieberman et al., 2004).

Dalším sporným bodem je vliv věku na funkční adaptaci kosti v zátěži (Pearson and Lieberman, 2004; Ruff et al., 2006). Některé výzkumy prokázaly větší (re)modelaci zatížené kosti u nedospělých jedinců (Turner and Robling, 2003). Tento fakt by měl být brán v úvahu při hodnocení a interpretaci vlastností CSG, srovnávání by měli být pouze jedinci podobné věkové kategorie (nedospělí x dospělí jedinci). Ačkoli je vliv mechanické zátěže u nedospělých jedinců výraznější, prokázaly výzkumy působení mechanické zátěže na kost i u dospělých jedinců (Robling et al., 2002). Rozdíly působení mechanické zátěže na kost nedospělých a dospělých jedinců by mohly být částečně způsobeny odlišnou citlivostí kosti (Ruff et al., 1994). Zatímco u nedospělých jedinců zřejmě dochází po zatížení k tvorbě kostní hmoty na periostálním povrchu, v dospělosti je kost tvořena na povrchu endostálním (Ruff et al., 1994). Vlastnosti CSG dospělých jedinců by proto mohly být ovlivněny aktivitou vykonávanou před dosažením dospělosti (Pearson and Lieberman, 2004).

Dalším diskutovaným problémem v interpretaci vlastností CSG je vliv genetických a dalších systémových faktorů na funkční adaptaci kosti. Největší otázkou pro antropology je míra ovlivnění struktury kosti dospělého jedince genetickými faktory. Některé aspekty morfologie kosti by mohly být daleko více ovlivněny genetickými mechanismy, než funkční adaptací kosti (Lovejoy et al., 2003). Protože genetické faktory pravděpodobně ovlivňují mechanismus adaptace kosti na mechanickou zátěž, doporučuje se srovnávat vlastnosti CSG jen mezi řezy ze stejných oblastí kosti a jedinců stejných, nebo příbuzných druhů (Ruff et al., 2006).

Cíl práce

Cílem diplomové práce je srovnat vliv motorické poruchy na rozložení hutné kostní tkáně transverzálního průřezu těla dlouhé kosti u dvou typů myší. Experimentální práce je cílena na typ Lurcher (geneticky determinovaná motorická porucha; viz materiál) a kontrolní skupinu (soubor myší s normální motorikou). Na transverzálním průřezu se budeme soustředit na biomechanické parametry rozložení hutné kostní tkáně. Vzhledem k tomu, že se geneticky podmíněná porucha motoriky u typu Lurcher projevuje nesměrovou zátěží na dlouhé kosti vlivem např. tremoru, astenie, adiadochokineze, dysmetrie nebo lokomoční lateropulze, pak předpokládáme že:

- a) U typu Lurcher se projeví nesměrová zátěž nejvýrazněji na cirkularitě průřezu dlouhé kosti, kdy se odhad cirkularity rozložení hutné kostní tkáně (např. I_{\max}/I_{\min}) bude blížit hodnotě 1. Pravděpodobně by se mohly lišit i jiné parametry geometrie průřezu např. hodnota I_{\max} , nebo plocha hutné kostní tkáně (CA). Následkem působení nesměrové zátěže předpokládáme nižší hodnotu I_{\max} , která vypovídá o oblasti průřezu nejvíce namáhané v ohybu. Plocha hutné kostní tkáně by mohla být u jedinců typu Lurcher menší, např. z důvodu zhoršené silové funkce svalů končetiny.
- b) U kontrolní skupiny je zátěž vzhledem k normální lokomoci vedena v převažujícím předozadním směru. Předpokládáme, že předozadní směrové zatížení se projeví dominující distribucí hutné kostní tkáně v předozadní ose a menším podílem hutné kostní tkáně v medio-laterálním směru. Výsledkem bude vyšší hodnota indexu cirkularity.

Materiál

Experimenty proběhly na dvou skupinách myši kmene B6CBA:

- (a) Lurcher typ (model olivocereberální poruchy; heterozygotní mutantní forma myši; +/-Lc; n = 10);
- (b) kontrolní skupina (zdraví jedinci; +/+; n = 10).

Věk laboratorních myši byl 9 měsíců, hmotnost se pohybovala v rozmezí od 22,14 g do 34,06 g (Tab. 4). Všichni testovaní jedinci byli samci. Mutantní myši typu Lurcher (Lc) jsou přirozeným animálním modelem dědičně podmíněné olivocerebelární degenerace (Phillips, 1960). Výhodou tohoto modelu je, že všechny motorické poruchy a tedy i působení mechanické zátěže na geometrické vlastnosti a mikrostrukturu kostní tkáň mohou být zkoumány na přirozeném a neinvazivně indukovaném stavu. Lc mutace je semi-dominantní (Zuo et al., 1997). Volba tohoto typu mutace umožňuje bez předchozího invazivního zásahu sledovat vliv cerebelární ataxie a jejich projevů (např. nekoordinovanost pohybů, třes) na hutnou kostní tkáň.

Olivocerebelární degenerace je u Lc mutantů způsobená mutovanou alelou genu pro $\delta 2$ -podjednotku glutamátového receptoru (GluR $\delta 2$) (Zuo et al., 1997) exprimovaného v Purkyňových buňkách mozečku (Araki et al., 1993). Mutace genu způsobuje masivní excitotoxickou apoptózu Purkyňových buněk (Zuo et al., 1997) a sekundárně i zánik granulárních buněk a neuronů dolní olivy (Wetts and Herrup, 1982). Degenerativní proces začíná v osmém postnatálním dni a končí v devadesáti dnech života, kdy nezůstávají v mozečku téměř žádné Purkyňovy buňky a přežívá jen přibližně 10 % granulárních buněk a 30 % neuronů dolní olivy (Caddy and Biscoe, 1976, 1979). Axony Purkyňových buněk jsou jedinými eferentními drahami mozečku a jejich zánikem dochází ke komplexní funkční dekortikaci mozečku. Mutantní myši typu Lurcher trpí cerebelární ataxií (Lalonde et al., 1992; Křížková and Vožeh, 2004), narušeny jsou však i některé další behaviorálně-kognitivní vlastnosti. Poruchy motoriky se u mutantních myši typu Lurcher projevují třesem, nesouměrností pohybů a špatnou koordinací, což umožňuje sledovat vliv neřízeného a multidirekčního pohybu na hutnou kostní tkáň. Vzhledem k tomu, že nemoc je dědičně podmíněna a její symptomy se začínají manifestovat již v prvním týdnu života

jedince, lze očekávat, že hutná kostní tkáň bude reagovat na nepřírozený pohyb změnou biomechanických vlastností.

Metody

Chov experimentálních zvířat zajistil Ústav patologické fyziologie LF UK v Plzni, který vlastní akreditaci pro provoz uživatelského zařízení a je tedy oprávněn provádět pokusy se zvířaty. Všechny pokusy byly prováděny v souladu s příslušnými právními normami EU o pokusech na zvířatech a s povolením Etické komise LF UK v Plzni. Metodická část práce byla rozdělena do dvou částí: (1) motorické testy; (2) analýza geometrie transverzálních průřezů dlouhých kostí.

Testy motorických vlastností

U experimentálních zvířat jsme vyšetřili a analyzovali následující motorické vlastnosti:

- 1) Motorické vlastnosti sestávaly ze silového testu na hrazdě a koordinačního testu na rotarodu (Křížková and Vožeh, 2004). Sledovali jsme schopnost zvířete udržet se na daném nářadí. Všechny metody (tj. hrazda a rotarod) byly v jednom dni opakovány čtyřikrát. Hodnotili jsme průměr všech čtyř pokusů.
- 2) Spontánní motorická aktivita byla testována metodou otevřeného pole – Open field (Hall, 1934) s využitím trackovacího systému EthoVision XT (Noldus Ltd.). Myš byla vložena do čtvercové plastové arény o straně 50 cm a v ní ponechána 10 minut. Hodnotili jsme následující parametry: délka dráhy, čas strávený pohybem, hybnost a rychlost jedince.

Výsledky testů motorických vlastností

Výsledky testů motorických vlastností jsou přebírány z dosud nepublikované studie (GAUK 408911; J. Tůma) a proto je zde uvádíme jen stručně. V Tab. 1 jsou shrnuty výsledky ze silového testu na hrazdě, koordinačního testu na rotarodu a testů spontánní motorické aktivity v otevřeném poli.

Hrazda

Jedinci typu Lurcher se na hrazdě udrželi signifikantně kratší dobu než kontrolní skupina (Tab. 1), což je pravděpodobně způsobeno projevy motorické poruchy, která může

vést k zhoršení svalové funkce a schopnosti koordinované kontrakce příslušných svalových skupin.

Rotarod

U jedinců typu Lurcher byl průměrný čas, po který se udrželi na rotarodu, signifikantně nižší, než u kontrolní skupiny (Tab. 1). Můžeme tedy předpokládat, že jedinci typu Lurcher mají sníženou schopnost koordinace pohybů, které jsou podmíněny především poruchou procesu řízení a regulace pohybové činnosti.

Open field

Výsledky spontánní motorické aktivity jsou uvedeny v Tab. 1. Mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou byl signifikantní rozdíl v hybnosti. Hybnost je u jedinců typu Lurcher pravděpodobně zvýšena třesem a lateropulzí, které jsou způsobeny motorickou poruchou. U ostatních testů v otevřeném poli (dráha, pohyb, rychlost) nebyly rozdíly mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou statisticky významné.

U jedinců typu Lurcher jsme zjistili signifikantní rozdíly v motorických vlastnostech (viz výše). Předpokládáme, že se tyto rozdílné motorické vlastnosti projeví na morfologii holenní kosti. Po skončení motorických testů následovala příprava histologických preparátů pro analýzu geometrických vlastností průřezu holenní kosti.

Příprava histologického preparátu

Holenní kost byla odebrána z levé končetiny. Kost jsme očistili od měkkých tkání a vložili do fixačního roztoku (Karnowskiho fixativum). Biomechanickou délku holenní kosti jsme změřili digitálním posuvným měřítkem Kinax (DIN 862; 150 mm; rozlišení 0,01 mm). Po změření jsme odebrali transverzální řezy v 50 % biomechanické délky holenní kosti (Obr. 7) pomocí pily s diamantovým kotoučem Isomet 1000 (Buehler Ltd.) (Obr. 8). Řezy měly tloušťku v rozmezí 300–500 μm . V dalším kroku jsme řezy zbrousily na konečnou tloušťku 50–100 μm . Broušení bylo manuální, pomocí dvou druhů brusných papírů Carbimet (velikost zrna 12 μm a 5 μm ; Buehler Ltd.). Každý preparát jsme nejprve zbrousili hrubším brusným papírem, dále jsme pokračovali papírem jemnějším, dokud se řez nedostal na požadovanou tloušťku. Po broušení jsme z transverzálního řezu vymyli kostní dřev, která by mohla později preparát znehodnotit. Vzorky jsme vložili do fixačního roztoku a uložili do chladu a temna.

Při histologickém barvení jsme postupovali dle studie Ciani et al. (2009). Preparáty byly nejprve dehydratovány ve vzestupně seřazených roztocích etanolu (75%, 95% a 100%; 5 minut v každém). Pro zobrazení intersticiálního kostního prostoru jsme použili fluorescenčního barviva FITC (Sigma-Aldrich Ltd.) rozpuštěného ve 100% etanolu v koncentraci 1 %. Transverzální řezy byly umístěny do 20 ml tohoto barvicího roztoku a opatrně promíchávány po dobu 2 hodin. Poté byly preparáty proplachovány ve 100% etanolu po dobu 30 minut, nechaly se osušit a umístily na laboratorní sklíčko. Aby se po obarvení co nejvíce předcházelo ztrátě fluorescence, byly vzorky po celou dobu uchovávány ve tmě.

Zobrazení preparátu v konfokálním mikroskopu

Nabarvené preparáty jsme postupně skenovali v invertovaném konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 s AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*) systémem, zajišťujícím vysoký stupeň citlivosti. Nastavené skenovací parametry konfokálního mikroskopu byly u všech vzorků totožné. Jednalo se zejména o rozlišení (2048×2048 pixelů), rozsah skenování, barevnou škálu (zelený, červený a modrý kanál), velikost pixelu, ($0,732 \mu\text{m}$), vzdálenost mezi skeny ($1,79 \mu\text{m}$). Všechny preparáty byly snímány objektivem s $10\times$ zvětšením, který pokryl celou plochu transverzálního řezu kosti.

Analýza CSG parametrů

Geometrické vlastnosti transverzálního průřezu těla holenní kosti jsme analyzovali pomocí softwaru ImageJ. Hodnotili jsme parametry plochy průřezu (TA, CA) a kvadratické momenty plochy průřezu (I_{\max} , I_{\min} , J) Hodnota TA zahrnuje celkovou plochu transverzálního průřezu kosti. Plocha hutné kostní tkáně (CA) vypovídá o odolnosti kosti v axiální kompresi a tahu (Larsen, 1999). Kvadratické momenty plochy průřezu (I) udávají odolnost kosti v ohybu. Dále jsme analyzovali oblasti I_{\max} a I_{\min} , oblasti s největší a nejmenší odolností kosti v ohybu a index cirkularity (I_{\max}/I_{\min}) k porovnání tvaru průřezu kosti. Hodnota polárního kvadratického momentu plochy průřezu (J) udává odolnost kosti v torzi (Larsen, 1999).

Ke srovnání vlivu mechanické zátěže na plošné parametry CSG by měly být výsledky standardizovány na hmotnost jedince (Ruff et al., 1993). U parametrů vyjadřujících odolnost kosti v ohybu, nebo torzi by se také mělo počítat s biomechanickou délkou kosti (Ruff et al., 1993). Hodnoty celkové plochy průřezu (TA) a plochy hutné

kostní tkáně (CA) jsme tedy standardizovali na hmotnost jedince a hodnoty I_{\max} , I_{\min} a J jsme standardizovali na hmotnost jedince násobenou biomechanickou délkou kosti.

Výstupem z konfokálního mikroskopu bylo z každého řezu přibližně 50 skenů. Proto jsme nejprve museli otestovat, zda se budou lišit hodnoty geometrických vlastností z prvního, středního, anebo posledního skenu. Test neprokázal signifikantní rozdíl mezi změřenými geometrickými parametry jednotlivých skenů. Pro analýzu tedy nebylo podstatné, který ze skenů transverzálního řezu zvolíme.

Pro analýzu geometrických vlastností transverzálního řezu kosti jsme v softwaru ImageJ vytvořili vlastní makro. Po otevření skenu v softwaru ImageJ jsme spustili makro pro analýzu geometrických parametrů. Nejprve jsme u každého skenu odhadli a ručně vymezili periostální i endosteální hranici hutné kostní tkáně (ROI). Ze zadaných ROI jsme následně spočítali základní geometrické parametry řezu (TA, CA, I, I_{\max} , I_{\min}). Tyto hodnoty jsme přenesli do tabulky Excel a dopočítali hodnoty indexu cirkularity průřezu ($\text{index}_{\text{cirkularita}} = I_{\max} / I_{\min}$) a polárního kvadratického momentu průřezu ($J = I_{\max} + I_{\min}$). Hodnoty TA, CA jsme standardizovali na hmotnost jedince a hodnoty I a J na hmotnost jedince násobenou délkou kosti. Testovali jsme intraobservační chybu měření (viz níže). Obrazovým výstupem makra v programu ImageJ byl sken se zakreslenými osami I_{\max} a I_{\min} , které znázorňují oblasti řezu nejvíce a nejméně odolné v ohybu (Obr. 9).

Test intraobservační chyby CSG

Intraobservační chyba vzniká při opakovaných měřeních stejného parametru jednou osobou. Účelem testování intraobservační chyby je zjistit spolehlivost metody měření.

Test intraobservační chyby sestával z osmi opakovaných měření CSG na deseti jedincích. Intraobservační chybu jsme počítali dle metody uvedené ve studii Sládek et al. (submitted). Chybu jsme stanovili z hodnot celkové plochy průřezu (TA) (Tab. 2) a polárního kvadratického momentu plochy průřezu (J) (Tab. 3). Rozdíly mezi jednotlivými měřeními jsme počítali pomocí průměrné chyby (MD – *mean difference*). Průměrná chyba nabývá plusových, či minusových hodnot. Pro výpočet MD jsme dle studie Sládek et al. (submitted) použili následující vzorec:

$$MD = \frac{\sum_{i=1}^n (M1_i - M2_i)}{n}$$

Za M1 jsme dosadili hodnotu prvního srovnávaného měření, za M2 jsme dosadili hodnotu posledního měření a n je velikost souboru ($n = 10$). Poslední (osmé) měření jsme zvolili jako referenční, protože jsme předpokládali, že se s opakováním měření bude chyba postupně zmenšovat. Celkovou chybu mezi jednotlivými měřeními jsme vyjádřili průměrnou absolutní chybou měření (MAD – *mean absolute difference*). Hodnoty průměrné absolutní chyby nabývají pouze kladných hodnot. K výpočtu MAD jsme použili následujícího vzorce (Sládek et al., submitted):

$$MAD = \frac{\sum_{i=1}^n |M1_i - M2_i|}{n}$$

Významy zkratk jsou popsány výše. Do vzorců jsme postupně za M1 dosadili hodnoty prvního až sedmého měření a za M2 jsme dosadili vždy hodnoty posledního (osmého) měření (Tab. 2 a 3).

Interval, ve kterém bychom očekávali 95 % rozdílů mezi měřeními, jsme odhadli limitem souhlasu (95% LA – 95% *limits of agreement*). Zmíněný 95% LA jsme vypočítali dle následujícího vzorce (Bland and Altman, 1986):

$$LA = MD \pm 1,96 \cdot SD$$

K interpretaci hodnot LA a MAD musí být dána akceptovatelná chyba. Akceptovatelná chyba je často odvozena z hodnot získaných z empirických výzkumů (Meloun and Militký, 1998). Hodnota akceptovatelné chyby byla v naší práci 5 %. Ke stanovení akceptovatelné chyby našich výsledků jsme vycházeli z CSG analýz předchozích studií (O'Neill and Ruff, 2004; Sládek et al., 2010).

Jak jsme předpokládali, byla největší průměrná i průměrná absolutní hodnota mezi prvním a osmým měřením. Postupně s dalšími měřeními se chyba zmenšovala (Tab. 2 a 3), od třetího měření již byly hodnoty vyrovnané. Z tohoto důvodu jsme osmé měření zvolili jako referenční. Průměrná chyba mezi sedmým a osmým měřením byla u hodnoty TA rovna 0,008 (0,68%), u hodnoty J pak 0,003 (1,56%). Průměrná absolutní chyba mezi sedmým a osmým měřením byla u hodnoty TA rovna 0,009 (0,71%) a u hodnoty J potom 0,004 (1,70%). Horní a dolní 95% limity shody (LA) konečné průměrné chyby měření byly

u hodnot TA -0,006; 0,023 a u hodnot J pak 0,003; 0,010. Žádná z těchto hodnot nebyla větší než 5% akceptovatelná chyba měření.

Metody statistického šetření

Ke statistickým výpočtům jsme použili software Statistica 6.0 (StatSoft, 1984–2001) a Excel 07 (Microsoft Corporation, 1985–2007). Pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými parametry dvou souborů jsme použili dvouvýběrový t-test a Mann-Whitney test (na 5% hladině významnosti). Symetrie a variabilita souborů pro hmotnost a biomechanickou délku holenní kosti byla vyjádřena pomocí krabicových grafů. V grafech uvádíme průměr, směrodatnou chybu (SEM) a směrodatnou odchylku (SD) jedinců typu Lurcher a kontrolní skupiny.

Vzhledem k tomu, že jsou CSG parametry závislé na proměnných jako je hmotnost a hmotnost násobená biomechanickou délkou holenní kosti a oba tyto parametry jsou měřeny s chybou, použili jsme model redukované hlavní osy (RMA – *reduced major axis*) k porovnání vztahu studovaných proměnných (Sládek et al., 2006 a). Redukovaná hlavní osa byla spočítána dle programu pro RMA regresi (Bohonak, 2002). Sklon a průsečík s osou y byl odhadnut 95% intervalem spolehlivosti pomocí principu generace simulovaných výběrů (*bootstrap*). K porovnání rozdílů v distribuci hodnot okolo redukované hlavní osy byl použit Fisherův exaktní test (Preacher and Briggs, 2001), kde jsme porovnávali počet jedinců nad redukovanou hlavní osou s počtem jedinců pod redukovanou hlavní osou.

Výsledky

Výsledky srovnání tělesných parametrů

Pro základní charakteristiku tělesných parametrů souboru jsme zvolili hmotnost jedince a biomechanickou délku (BML) holenní kosti. Hmotnost a BML jsme dále použili pro velikostní standardizaci parametrů CSG.

Výsledky průměrné hmotnosti jedince a biomechanické délky holenní kosti uvádíme souhrnně v Tab. 4. Průměrná hmotnost jedinců typu Lurcher byla 28,70 g, u kontrolní skupiny jsme naměřili průměrnou hmotnost 27,95 g. Průměrná hodnota biomechanické délky holenní kosti byla u jedinců typu Lurcher 17,49 mm, u kontrolní skupiny byl průměr hodnot BML roven 17,64 mm. Průměr, směrodatná chyba (SEM) a směrodatná odchylka (SD) hmotnosti a biomechanické délky jsou zobrazeny v Grafu 1 a 2. Distribuci hodnot biomechanické délky holenní kosti vztažených ke hmotnosti jedince uvádíme v Grafu 3. Z výsledků vyplývá, že rozdíly průměrné hmotnosti nebyly mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou statisticky významné (Tab. 4). Ukázalo se ale, že jedinci typu Lurcher měli o tři procenta větší průměrnou hmotnost, než kontrolní skupina. Na krabicovém grafu je patrné symetrické rozložení hodnot hmotnosti u jedinců typu Lurcher i kontroly (Graf 1). Velikost směrodatné odchylky je ale u kontrolní skupiny větší než u skupiny Lurcher. Ani v hodnotách biomechanické délky holenní kosti se jedinci typu Lurcher a kontrolní skupina signifikantně neodlišovali (Tab. 4). Jedinci typu Lurcher měli o jedno procento nižší biomechanickou délku holenní kosti než kontrolní skupina. Z krabicového grafu je patrné, že hodnoty biomechanické délky obou souborů byly symetricky rozložené (Graf 2). Velikost směrodatné odchylky byla u jedinců typu Lurcher i kontrolní skupiny podobná. Hodnoty biomechanické délky holenní kosti vztažené ke hmotnosti se mezi jedinci typu Lurcher a kontrolou signifikantně nelišily (Graf 3).

Z našich výsledků jsme nezjistili signifikantní rozdíl v tělesných parametrech mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou. Je však zajímavé, že jedinci typu Lurcher měli o tři procenta větší průměrnou hmotnost a zároveň o jedno procento nižší biomechanickou délku holenní kosti, nejedná se tedy o stejný velikostní efekt. Výsledky budou detailněji popsány v diskuzi, lze však předpokládat, že by mohly být ovlivněny např. malou velikostí souboru. Rozložení hodnot tělesných parametrů je v obou souborech symetrické, u hmotnosti jsme ale zjistili větší rozptyl hodnot kontrolní skupiny.

Výsledky CSG holenní kosti

Plochy průřezu: TA, CA

Standardizované hodnoty plošných parametrů CSG holenní kosti, tj. celková plocha průřezu a plocha hutné kostní tkáně, jedinců typu Lurcher a kontroly uvádíme v Tab. 4. Hodnoty plochy průřezu byly standardizovány hmotností. U jedinců typu Lurcher byla naměřena průměrná hodnota TA $1,187 \text{ mm}^2$ a průměrná adjustovaná hodnota TA byla $0,042 \text{ mm}^2/\text{g}$. Kontrolní skupina měla průměr hodnot TA rovnající se $1,232 \text{ mm}^2$ a průměr adjustovaných hodnot TA byl $0,045 \text{ mm}^2/\text{g}$. Průměrná hodnota CA byla u jedinců typu Lurcher $0,752 \text{ mm}^2$, po adjustaci potom $0,027 \text{ mm}^2/\text{g}$. U kontrolní skupiny jsme naměřili průměrnou hodnotu CA rovnající se $0,775 \text{ mm}^2$, adjustovaná hodnota CA byla $0,028 \text{ mm}^2/\text{g}$. Distribuce hodnot celkové plochy průřezu holenní kosti vztažených ke hmotnosti jedince je zobrazena v Grafu 4. Distribuci hodnot hutné kostní tkáně (CA) holenní kosti vztažených ke hmotnosti jedince uvádíme v Grafu 5.

Průměrná hodnota celkové plochy průřezu byla u jedinců typu Lurcher o čtyři procenta menší, než u kontrolní skupiny, nevykazovala však oproti předpokladu signifikantní rozdíl (Tab. 4). Jedinci typu Lurcher a kontrolní skupina se signifikantně nelišili ani u hodnot plochy hutné kostní tkáně (Tab. 4). Průměrná hodnota plochy hutné kostní tkáně byla u jedinců typu Lurcher o tři procenta menší než u kontrolní skupiny. Mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou nebyl signifikantní rozdíl v celkové ploše průřezu vztažené k hmotnosti jedince (Graf 4). Stejně tak se neukázal signifikantní rozdíl ve velikosti plochy hutné kostní tkáně vztažené k hmotnosti jedince (Graf 5). Z výsledků parametrů plochy průřezu vyplývá, že jedinci typu Lurcher a kontrolní skupiny měli podobné množství hutné kostní tkáně ve srovnání s celkovou plochou průřezu a hmotností jedince.

Závěrem lze shrnout, že jedinci typu Lurcher a kontrolní skupiny měli podobné plošné parametry CSG (tj. axiální robusticitu). Hodnoty celkové plochy průřezu i plochy hutné kostní tkáně byly u jedinců typu Lurcher menší, ale nevykazovaly oproti předpokladu signifikantní rozdíl. Výsledky tedy nepotvrzují náš předpoklad vlivu motorické poruchy na plošné parametry CSG. Projevy motorické poruchy (např. zhoršení svalové funkce končetin) nezpůsobily signifikantní snížení velikosti plochy hutné kostní tkáně u jedinců typu Lurcher.

Kvadratické momenty plochy průřezu

Standardizované hodnoty polárního kvadratického momentu plochy průřezu, tj. odhad celkové ohybové/torzni robusticity, uvádíme v Tab. 4. Hodnoty kvadratického momentu plochy průřezu byly standardizovány součinem hmotnosti a biomechanické délky holenní kosti. Průměrná hodnota J byla u skupiny Lurcher $0,205 \text{ mm}^4$ a po adjustaci $0,0004 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$. U kontrolní skupiny jsme naměřili průměrnou hodnotu J rovnající se $0,219 \text{ mm}^4$, po adjustaci byla průměrná hodnota J u kontroly $0,0005 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$. Rozmístění hodnot polárního kvadratického momentu plochy průřezu ve vztahu k hmotnosti a biomechanické délce holenní kosti je zobrazeno v Grafu 6.

Hodnoty polárního kvadratického momentu plochy průřezu nevykazovaly mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl (Tab. 4). Hodnota J , nebo také robusticita kosti vztažená k zátěži v ohybu a zkrutu, byla u jedinců typu Lurcher o sedm procent menší než u kontrolní skupiny. Distribuce hodnot polárního kvadratického momentu plochy průřezu vztažených k součinu hmotnosti a BML nebyla mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou signifikantně odlišná (Graf 6). Výsledky nepotvrdily náš předpoklad, že motorická porucha způsobí statisticky významné zmenšení hodnot polárního kvadratického momentu plochy průřezu (tj. celkové ohybové/torzni robusticity).

Vzhledem k tomu, že polární kvadratický moment plochy průřezu je součtem parametrů odolnosti kosti v ohybu (tj. I_{\max} , I_{\min}) a vyjadřuje tak celkově ohybovou a torzni robusticitu, testovali jsme i jednotlivé kvadratické momenty plochy a jejich distribuci na průřezu. Standardizované hodnoty maximálních a minimálních kvadratických momentů plochy průřezu jsou pro jedince typu Lurcher a kontrolní skupiny shrnuty v Tab. 4. U jedinců typu Lurcher byl průměr hodnot I_{\max} roven $0,116 \text{ mm}^4$ a průměr hodnot I_{\min} byl $0,089 \text{ mm}^4$. Po adjustaci na součin hmotnosti a BML byla průměrná hodnota I_{\max} u skupiny Lurcher $0,00023 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$ a hodnota I_{\min} byla $0,00018 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$. U kontrolní skupiny jsme naměřili průměr hodnot I_{\max} rovnající se $0,123 \text{ mm}^4$ a pro I_{\min} potom $0,096 \text{ mm}^4$, průměr adjustovaných hodnot pro I_{\max} byl $0,00025 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$ a pro hodnotu I_{\min} pak $0,00020 \text{ mm}^4/\text{g}\times\text{mm}$. Hodnoty kvadratických momentů plochy průřezu vztažených k součinu hmotnosti a biomechanické délky holenní kosti uvádíme v Grafu 7 a 8.

Mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou jsme nenašli signifikantní rozdíl v maximálních a minimálních kvadratických momentech plochy průřezu (Tab. 4). Průměrná hodnota I_{\max} ale byla u jedinců typu Lurcher menší o šest procent a průměrná

hodnota I_{\min} byla menší o devět procent. Hodnoty kvadratických momentů plochy průřezu vztažené k hmotnosti a biomechanické délce neukázaly mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl (Graf 7 a 8).

Tvar průřezu holenní kosti, vycházející z distribuce rozdílů odolnosti v ohybu, jsme u jedinců typu Lurcher a kontrolní skupinou odhadli z indexu cirkularity (I_{\max}/I_{\min}). Hodnoty indexu cirkularity jsou shrnuty v Tab. 4. Průměr hodnot indexu cirkularity byl u jedinců skupiny Lurcher 1,303. U kontrolní skupiny byla průměrná hodnota indexu cirkularity 1,273. Hodnoty maximálních kvadratických momentů plochy průřezu vztažených k minimálním kvadratickým momentům plochy průřezu jsou uvedeny v Grafu 9.

Hodnoty indexu cirkularity neprokázali signifikantní rozdíl mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou (Tab. 4), přestože byla hodnota indexu cirkularity u jedinců typu Lurcher o dvě procenta větší. Hodnoty I_{\max} vztažené k hodnotám I_{\min} neukázaly rozdíl mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou (Graf 9).

Z výsledků vyplývá, že jedinci typu Lurcher a kontrolní skupina mají podobnou distribuci maximálních a minimálních kvadratických momentů plochy průřezu holenní kosti. Hodnoty indexu cirkularity jsou u jedinců skupiny Lurcher a kontroly podobné. Výsledky nepotvrdily náš předpoklad, že u jedinců typu Lurcher bude vlivem působení nesměrovosti zátěže hodnota I_{\max} a hodnota cirkularity průřezu signifikantně nižší. U kontrolní skupiny se nepotvrdila dominující distribuce hutné kostní tkáně v předozadní ose, která by se projevila většími hodnotami I_{\max} a indexu cirkularity.

Diskuze

Z výsledků našich analýz vyplývá, že parametry CSG (TA, CA, I_{\max} , I_{\min} , J) těla holenní kosti se mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou signifikantně neliší a tak nepotvrzují naše předpoklady o vlivu motorické poruchy na biomechanické vlastnosti holenní kosti. Důležitý je také nesignifikantní rozdíl v hodnotách cirkularity průřezu (I_{\max}/I_{\min}) mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou. Otázkou tedy zůstává, z jakého důvodu se statisticky významné změny motoriky jedinců typu Lurcher neprojevíly na rozložení hutné kostní tkáně holenní kosti. V následujícím textu jsou shrnuta možná vysvětlení našich výsledků a také faktory a limity, které mohly mít na výsledky práce vliv.

K analýze CSG parametrů holenní kosti byla v naší práci zavedena nová metoda histologického barvení kosterního materiálu (Ciani et al., 2009). Výhodou metody je především možnost analyzovat nedekalcifikovanou kost, což umožňuje nejen analýzu CSG parametrů, ale i histologickou analýzu lakuno-kanalikulárního systému. Histologické analýze transverzálních řezů holenní kosti se budeme věnovat v další fázi naší práce. Další výhodou nové metody je její spolehlivost, kterou jsme testovali pomocí intraindividuální chyby měření CSG parametrů (viz Materiál a metody).

Vzhledem k tomu, že jsme zaváděli novou metodu histologického barvení a zobrazení preparátů, testovali jsme každý krok v postupu práce. V první fázi, při odebrání transverzálního řezu holenní kosti pomocí pily s diamantovým kotoučem, jsme řešili jakým způsobem zajistit optimální, nepoškozený řez holenní kosti. Kost nebyla zalita v žádném médiu a práci nám ztěžovala také malá velikost preparátů. Pilu jsme proto upravili a přizpůsobili k práci s našimi vzorky. Upevnění kosti do pily jsme upravili tak, aby byla kost pevně fixována a při řezání se nepohnula a aby se zároveň nepoškodila tlakem fixačního zařízení. Optimalizovali jsme také rychlost otáček pily. V této fázi práce jsme ale nenašli způsob, jakým preparáty orientovat, tj. označit na průřezu předozadní (A-P) a mediolaterální (M-L) rovinu tak, aby označení zůstalo na preparátu až do konečné fáze zobrazení v programu ImageJ. Vzhledem k tomu, že pro naši práci nebyla orientace preparátu stěžejní, pokračovali jsme bez označení rovin. U broušení transverzálního průřezu kosti brusným papírem se ukázala jako nejlepší metoda manuální. Z důvodu velmi malé velikosti preparátů se při broušení neosvědčily žádné pomůcky a nástroje, nejpřesnější a nejcitlivější zůstala pro broušení lidská ruka. Postup barvení histologických

preparátů jsme také testovali a nakonec uzpůsobili dobu barvení preparátům tak, aby byla možná nejen analýza CSG, ale i pozdější analýza lakuno-kanalikulárního systému kosti. Skenování preparátů v konfokálním mikroskopu předcházelo testování nastavitelných parametrů mikroskopu. Parametry nastavení, které se ukázaly pro naši analýzu jako nejlepší, jsme potom použili pro skenování všech vzorků. Obrazovým výstupem z konfokálního mikroskopu bylo pro každý řez asi 50 skenů ve třech barevných kanálech. Testovali jsme, zda se budou lišit výsledky parametrů CSG skenů ze začátku, středu a konce průřezu a zda výsledky ovlivní volba barevného kanálu. Výsledky CSG nebyly u testovaných skenů statisticky významné. Nebylo proto podstatné, jaký sken z průřezu a jaký barevný kanál pro analýzu CSG zvolíme. Pro analýzu geometrických parametrů průřezu jsme v programu ImageJ vytvořili vlastní makro. Pro analýzu CSG parametrů bylo na skenu potřeba ručně vymezit periostální a endosteální hranici kosti. Analýzu v programu ImageJ prováděla pouze jedna osoba. Spolehlivost měření jsme zjistili pomocí testu intraindividuální chyby dle studie Sládek et al. (Sládek et al., submitted). U deseti jedinců jsme osmkrát měřili celkovou plochu průřezu a polární moment plochy průřezu. Z výsledků testu intraindividuální chyby vyplývá, že postup analýzy CSG parametrů není zatížen vyšší než akceptovatelnou chybou měření (viz Materiál a metody). Dalším krokem práce byla analýza parametrů CSG naskenovaných preparátů. Výsledky byly rozděleny do dvou celků: (a) výsledky tělesných parametrů; (b) výsledky CSG holenní kosti.

Z výsledků tělesných parametrů jedinců typu Lurcher a kontrolní skupiny vyplývá, že rozdíly ve hmotnosti jedince a v biomechanické délce holenní kosti nejsou statisticky významné. Ve výsledcích jsme upozornili na nestejný velikostní efekt tělesných parametrů. Jedinci typu Lurcher měli o tři procenta větší hmotnost a zároveň byla jejich biomechanická délka holenní kosti o jedno procento menší. Z předchozích studií, ve kterých se vycházelo z antropometrických měření člověka, je zřejmé, že hmotnost by měla mít lineární vztah k výšce jedince (Kemsley et al., 1962). Vzhledem k tomu, že výška jedince by měla pozitivně korelovat s délkou holenní kosti (Ruff, 2000; 2002), měl by být vztah i mezi hmotností jedince a délkou holenní kosti lineární. Protože u většiny savců je délka kostí končetin přibližně proporcionalní k hmotnosti (Alexander et al., 1979), můžeme u myši předpokládat stejný efekt, i když se jedná o kvadrupední živočichy, u kterých se výškový parametr nepoužívá. Vysvětlením našich rozdílných výsledků by mohla být malá velikost souboru. Pro další práci proto plánujeme rozšíření souboru

jedinců. Zajímavá je také distribuce hodnot biomechanické délky holenní kosti vztažených k hmotnosti jedince. Na Grafu 3 je patrné rozdělení hodnot kontroly do dvou pomyslných skupin. Rozložení hodnot hmotnosti je ale dle Grafu 1 u jedinců typu Lurcher i kontroly symetrické. Netypické rozdělení hodnot hmotnosti jedinců kontrolní skupiny je pravděpodobně způsobeno nehomogenitou náhodného výběru jedinců a malou velikostí souboru.

Výsledky parametrů plochy CSG (celková plocha průřezu a plocha hutné kostní tkáně) neprokázaly signifikantní rozdíl mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou. Parametry plochy průřezu byly standardizovány hmotností jedince. Na Grafu 4 a 5 je také patrné rozdělení jedinců kontroly do dvou skupin dle hodnot hmotnosti na ose x, jak jsme již zmínili výše. Jedinci typu Lurcher a kontrolní skupina měli podobné množství hutné kostní tkáně vztažené k celkové ploše průřezu a hmotnosti jedince. Nepotvrdil se tedy náš předpoklad o vlivu motorické poruchy na parametry plochy CSG, kde by např. snížení svalové funkce u jedinců typu Lurcher způsobilo menší plochu hutné kostní tkáně na průřezu holenní kosti.

Z výsledků analýz kvadratických momentů plochy průřezu (J , I_{\max} , I_{\min}) a indexu cirkularity (I_{\max}/I_{\min}) je patrné, že rozdíly mezi jedinci skupiny Lurcher a kontroly nebyly statisticky významné. Výsledky nepotvrzují náš předpoklad, že motorická porucha způsobí signifikantní zmenšení hodnot polárního kvadratického momentu plochy průřezu (tj. celkové ohybové/torzni robusticity) a že následkem nesměrovosti zátěže jedinců typu Lurcher, bude hodnota I_{\max} a cirkularita průřezu signifikantně menší. Nabízí se zde otázka, zda byly projevy motorické poruchy natolik významné, aby ovlivnily geometrické parametry průřezu holenní kosti. Projevy motorické poruchy jsme testovali pomocí motorických testů.

Motorická porucha je u jedinců typu Lurcher způsobena projevy mozečkové ataxie. Projevy motorické poruchy se začínají objevovat krátce po narození a plně se manifestují ve třech měsících života. V naší studii bylo stáří jedinců devět měsíců, jednalo se tedy o dospělé jedince, u kterých se motorická porucha mohla plně projevit a způsobit tak změny v rozložení hutné kostní tkáně. K ovlivnění motoriky došlo neinvazivně. Neinvazivně navozené změny v motorických vlastnostech jedince typu Lurcher nám umožnily sledovat vliv motoriky na rozložení hutné kostní tkáně průřezu kosti, aniž bychom způsobem experimentu zasáhli do adaptačních procesů kosti.

Výsledky motorických testů ukázaly signifikantní rozdíly mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou (hrazda, rotarod, hybnost). Silový test na hrazdě by měl vypovídat o schopnosti jedince aktivně zapojit svalové skupiny na přední končetině. U jedinců skupiny Lurcher byl naměřen signifikantně kratší čas, po který se na hrazdě udrželi. To by mohlo být způsobeno změnami v síle a koordinaci svalových skupin (projevy mozečkové ataxie). Mozečková ataxie může způsobit u jedinců typu Lurcher změny ve struktuře svalu (Hartmann et al., 2001). Ve studii Hartmann et al. (2001) se u jedinců typu Lurcher ukázala redukce myozinu ve svalech, která by mohla způsobit jejich oslabení. Vzhledem k tomu, že tah svalů vytváří mechanickou zátěž, která působí na kost (Pearson and Lieberman, 2004), předpokládali jsme, že se menší síla svalů projeví na parametrech CSG. Dle modelu funkční adaptace kosti (Ruff, 2007) by se snížená svalová aktivita u jedinců typu Lurcher mohla projevit nižší úrovní deformace kosti a sníženým nárůstem kostní hmoty (axiální a torzní robusticity). Jak již bylo zmíněno, přestože byly v naší práci hodnoty CA, TA a J u jedinců typu Lurcher menší než u kontrolní skupiny, neprokázali jsme signifikantní rozdíl a tím také nepotvrdili náš původní předpoklad. Průměrná hodnota CA, TA a J byla u obou skupin podobná.

Dalším motorickým testem, ve kterém se ukázal signifikantní rozdíl mezi jedinci skupiny Lurcher a kontrolní skupinou, byl rotarod a hybnost (Open field). Oba tyto testy vypovídají o snížené schopnosti koordinace pohybů u jedinců typu Lurcher. Větší hybnost v otevřeném poli je u těchto jedinců navíc ještě dána třeselem a lateropulzí. Předpokládali jsme, že se tato nesměrovost pohybů jedinců typu Lurcher projeví na hodnotách I_{\max} a cirkularitě průřezu (I_{\max}/I_{\min}) holenní kosti. Podle našeho předpokladu by měla být u jedinců typu Lurcher signifikantně nižší hodnota I_{\max} a indexu cirkularity. Nicméně, výsledky CSG holenní kosti tento předpoklad nepotvrdily. Jedinci typu Lurcher a kontrolní skupina měli podobné hodnoty I_{\max} i hodnoty cirkularity průřezu.

Můžeme tedy shrnout, že i když se ukázaly statisticky významné rozdíly v motorických vlastnostech mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou, nezpůsobily tyto rozdíly takové změny v působení mechanických sil, které by vedly ke statisticky významným změnám ve vlastnostech CSG.

Otázkou zůstává, proč se statisticky významné změny v motorických vlastnostech u jedinců typu Lurcher neprojevily v rozložení hutné kostní tkáně na transverzálním průřezu holenní kosti. Jedním z důvodů by mohla být malá velikost souboru, u kterého se rozdíly v

CSG nemusely významně projevit. Pro další práci proto počítáme s rozšířením souboru jedinců.

Dalším možným vysvětlením je působení mechanické zátěže na rozložení hutné kostní tkáně až po překročení určitého prahu. Vzhledem k tomu, že adaptace kosti na mechanickou zátěž je s velkou pravděpodobností reakcí na velikost působící deformace, mohlo by se jednat o deformační prahové hodnoty. Přítomnost deformačních prahových hodnot, které vyvolají proces remodelace byla popsána již v teorii mechanostatu (Frost, 1987). Změny v rozložení hutné kostní tkáně průřezu by se tedy ukázaly až po překročení deformačních prahových hodnot. Testování prahových hodnot a velikosti působící deformace je však obtížné a většinou vyžaduje invazivní zásah do organismu jedince. Studie, ve kterých jsou adaptační mechanismy kosti zkoumány neinvazivně, většinou využívají působení nefyziologické zátěže o známé velikosti (Robling et al., 2002; De Souza et al., 2005). Bylo by proto poněkud sporné aplikovat získané poznatky na jedince s normální fyziologickou zátěží. Pro výpočet deformačních sil způsobených normální fyziologickou zátěží jedince se využívá přímé měření deformace in vivo (Demes et al., 2001; Lieberman et al., 2004). Na kost jedince je chirurgicky připevněno zařízení měřící velikost deformace. Jak jsme již upozornili, problémem by mohla být invazivita experimentu, která může nepřímo ovlivnit adaptační mechanismy kosti.

Přítomnost prahových hodnot bychom u jedinců typu Lurcher a kontroly mohli testovat zvýšením fyzické aktivity jedinců. Neměli bychom přesná data o velikosti působících sil a deformace, ale vyhnuli bychom se invazivním zásahům a působení nefyziologické zátěže na kost. Pokud by se ukázaly změny v CSG mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou po zvýšení aktivity, podpořilo by to teorii přítomnosti prahových hodnot. Předpokládali bychom, že se změní zejména CSG parametry jedinců kontrolní skupiny s normální motorikou, kteří by tak využili svůj zbylý pohybový potenciál (Graf 10). Vlivem zvýšené aktivity, by se mohl u kontrolních jedinců projevit převažující pohyb v předozadním směru na parametrech CSG. U jedinců typu Lurcher bychom naopak významné změny v CSG ve srovnání s předchozími výsledky již neočekávali.

Přítomnost prahových hodnot by také mohla vysvětlovat, proč se při testování funkční adaptace kosti ukazují signifikantní rozdíly v parametrech CSG např. u sportovců (Sone et al., 2006; Wilks et al., 2009), či jedinců s nefyziologickou zátěží končetin

(Rittweger et al., 2010). Na rozdíl od dalších studií, zkoumajících např. rozdíly CSG parametrů mezi skupinami s různou strategií obživy, kde se statisticky významné rozdíly neobjevily (Bridges, 1989; Sládek et al., 2006 a). Pokud by se tedy změny v CSG parametrech projeví až po překročení určitých prahových hodnot, bylo by poněkud obtížné srovnávat a interpretovat výsledky analýz souborů jedinců s normální fyzickou aktivitou. Znamenalo by to například, že bychom v bioarcheologických studiích nebyli schopni podle parametrů CSG analyzovat rozdíly v chování vycházející ze strategie obživy, protože by se tyto rozdíly u jedinců s normální fyzickou aktivitou nemusely na morfologii kosti vůbec projevit. Pro objasnění tohoto rozporu ale bude potřeba dalších analýz a testování způsobu adaptace kosti na mechanickou zátěž.

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledky naší práce, by mohla být volba dlouhé kosti, kterou jsme pro analýzu CSG zvolili, tj. holenní kost. I když se holenní kost pro testování adaptace kosti na mechanickou zátěž často využívá (Fritton et al., 2005; De Souza et al., 2005), je možné, že by se motorická porucha jedinců typu Lurcher mohla projevit více na dlouhých kostech přední končetiny. Přední končetina nese menší část hmotnosti jedince než holenní kost a při některých běžných aktivitách jedince (např. čištění) je zatížena hmotností minimálně, třes by se proto na kosti přední končetiny mohl projevit více. Vzhledem k tomu, že jsme odebírali všechny dlouhé kosti souboru jedinců, plánujeme do budoucna také analýzu CSG humeru.

Jak již bylo zmíněno, vycházeli jsme v naší práci z toho, že proces adaptace kosti je řízen lokálními faktory (působením mechanických sil a momentů). Výsledky analýz však neprokázaly působení lokálních faktorů na adaptační mechanismy holenní kosti, čímž se náš původní předpoklad nepotvrdil.

Vliv systémových faktorů na adaptaci kosti jsme se snažili kontrolovat volbou souboru, výběrem dlouhé kosti a lokalizací průřezu kosti. Abychom eliminovali působení systémových reparačních mechanismů kosti (např. hojení zprostředkované imunitním systémem po invazivním zásahu, či působení nefyziologické zátěže), zvolili jsme model neinvazivního ovlivnění motoriky. U jedinců typu Lurcher se začíná motorická porucha manifestovat krátce po narození, k ovlivnění motoriky není tedy třeba žádného invazivního zásahu. Dalším systémovým faktorem, který mohl ovlivnit adaptaci kosti na mechanickou zátěž, byl věk a pohlaví jedinců souboru. Mechanická zátěž pravděpodobně způsobuje větší (re)modelaci kosti u nedospělých jedinců, než u jedinců dospělých (Turner and

Robling, 2003). V našem souboru bylo proto stáří a pohlaví u všech jedinců stejné, jednalo se o dospělé samce. Největší neznámou je pro antropology vliv genetických faktorů na adaptační mechanismy kosti. Ve studii jsme jako animální model použili myši inbredního kmene B6CBA. Inbrední kmen je skupina genotypově stejných zvířat vzniklá příbuzenským křížením, měl by se tedy omezit vliv genetických faktorů na výsledky CSG. Vzhledem k tomu, že různé kosti i části kostí mohou reagovat na mechanickou zátěž odlišně, odebírali jsme transversální řezy u všech jedinců v 50 % biomechanické délky holenní kosti. Tím bychom měli opět omezit vliv systémových faktorů na adaptační mechanismy kosti. Limitem by však mohl být vliv geneticky podmíněné motorické poruchy na funkční adaptaci kosti, který zatím není znám. Vzhledem k tomu, že se ale výsledky CSG jedinců typu Lurcher a kontrolní skupiny významně nelišily, nepředpokládáme vliv genetických faktorů na morfologii kosti u jedinců typu Lurcher. Lze tedy shrnout, že ačkoli se působení systémových faktorů nedá vyloučit a do jisté míry by se s ním mělo počítat, v naší práci by mělo být působení systémových faktorů omezeno (viz výše).

Jak jsme již upozornili, je testování funkční adaptace kosti u jedinců s normální fyzickou aktivitou obtížné. Přestože se ve výsledcích nepotvrdilo působení lokálních faktorů na adaptaci kosti, pravděpodobně se jedná spíše o následek způsobu provedení experimentu. Z důvodů, které jsme zmínili výše, by se lokální faktory mohly projevit např. po zvýšení aktivity zkoumaných jedinců. Z našich výsledků však nelze prokázat ani vyloučit působení lokálních a systémových faktorů na adaptační mechanismy kosti. Pro testování způsobu adaptace kosti na mechanickou zátěž bude tedy potřeba dalších analýz. V další práci bychom se chtěli věnovat histologické analýze lakuno-kanalikulárního systému transversálního průřezu kosti a způsobu jakým by mohla tuto porozitu ovlivnit mechanická zátěž. Chtěli bychom se soustředit na otázku anizotropie a nehomogenity mikrostruktury kosti a také na ovlivnění mikrostruktury motorickou poruchou jedinců typu Lurcher.

Způsob provedení experimentu nedovoloval testovat adaptaci kosti na mechanickou zátěž na člověku. I když experimenty probíhaly na myším modelu, mohou mít poznatky přínos i pro výzkumy mobility a manipulativního chování minulých populací člověka, ale i dalších témat antropologie, či lékařství a evoluční biologie. Cílem experimentálních výzkumů je vytvořit vhodný model, který by umožnil testovat adaptaci kosti na

mechanickou zátěž (Ruff et al., 2006) a následně tyto informace aplikovat na výzkum adaptačních mechanismů kosti u člověka.

K častým otázkám v souvislosti s adaptací kosti na mechanickou zátěž minulých i současných populací patří např. evoluce lokomočního chování, změny ve struktuře kosti během růstu a vývoje, nebo vliv strategie obživy na chování atd. (Ruff and Hayes, 1983; Ruff et al., 1984, 1993, 1994; Trinkaus et al., 1999, 2002; Sládek et al., 2006 a, 2006 b, 2007). Antropologové se velmi často věnují otázce projevů chování vycházejících z konkrétní strategie obživy minulých populací. Z tohoto hlediska se výzkumy biomechanických vlastností kostí soustředí na charakteristické skupiny, jako jsou lovci-sběrači, pastevci, nebo zemědělci. Znalosti z experimentálních studií mohou významně přispět ke správné interpretaci analýz kosterních nálezů minulých populací. Také v dalších odvětvích antropologie jsou informace o adaptaci na mechanickou zátěž podstatné. Např. ve forenzní antropologii je důležitá správná interpretace kosterního materiálu pro potřeby identifikace nálezů. Testování způsobu adaptace na mechanickou zátěž je důležité také pro lékařské obory, např. traumatologii, ortopedii, endokrinologii, sportovní lékařství atd. (Frost, 2001). Klinické výzkumy současných populací využívají vlastnosti morfologie kosti např. k odhadu vlivu specifické aktivity (Haapasalo et al., 1996; Wilks et al., 2009; Rittweger et al., 2010), či vlivu systémových faktorů jako např. věk, pohlaví, hormonální stav a genetické faktory (Rauch et al., 1999; Bouxsein and Karasik, 2006; Sone et al., 2006; Tommasini et al., 2007; Wetzsteon et al., 2009). Experimentální testování způsobu, jakým se kost adaptuje na mechanickou zátěž, je tedy důležité nejen pro antropologii, ale i pro mnoho dalších oborů (viz výše). V antropologii mohou vést výsledky této práce k novým možnostem testování parametrů hutné kostní tkáně.

Závěr

Biomechanická analýza transverzálního průřezu odebraného v 50 % BML těla holenní kosti neprokázala signifikantní rozdíly v parametrech CSG mezi jedinci s motorickou poruchou (typ Lurcher) a jedinci s normální motorikou (kontrolní skupina). Motorická porucha se sice projevila významnými změnami v motorických vlastnostech jedinců typu Lurcher, tyto změny však nezpůsobily signifikantní rozdíly v působení mechanické zátěže na tělo holenní kosti. Výsledky indexu cirkularity neprokázaly signifikantní rozdíl ve tvaru průřezu holenní kosti jedinců typu Lurcher, u nichž jsme předpokládali změny způsobené nesměrovou zátěží končetiny, a kontrolní skupiny s převažující zátěží v předozadním směru. Ani další parametry CSG (TA, CA, I_{max} , I_{min} , J) se mezi jedinci typu Lurcher a kontrolní skupinou signifikantně nelišily. Z výsledků CSG parametrů nemůžeme potvrdit působení lokálních faktorů tremoru, astenie, adiadochokineze, dysmetrie nebo lokomoční lateropulze na biomechanickou adaptaci kosti. Přestože experiment probíhal na myším modelu, mohou výsledky této práce přispět k dalším možnostem testování parametrů hutné kostní tkáně. Získané poznatky o způsobu adaptace kosti na mechanickou zátěž pak mohou být využity nejen v antropologii, ale i v dalších oborech.

Citovaná literatura

- Alexander RM, Jayes AS, Maloiy GMO, and Wathuta EM. 1979. Allometry of the limb bones of mammals from shrews (*Sorex*) to elephant (*Loxodonta*). *Journal of Zoology* 189:305–314.
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, and Mishina M. 1993. Selective expression of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197:1267–1276.
- Bentolila V, Boyce T, Drumb R, Fyhrie D, Skerry T, and Schaffler M. 1998. Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone* 23:276–281.
- Bertram J, and Swartz S. 1991. The “law of bone transformation”: a case of crying Wolff? *Biological Reviews* 66:245–273.
- Bland J, and Altman D. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* i:307–310.
- Bohonak A. 2002. RMA: software for reduced major axis regression. San Diego: San Diego State University.
- Bouxsein M, and Karasik D. 2006. Bone geometry and skeletal fragility. *Current Osteoporosis Reports* 4:49–56.
- Bridges P. 1989. Changes in activities with the shift to agriculture in the Southeastern United States. *Current Anthropology* 30:385–394.
- Caddy K, and Biscoe T. 1976. The number of Purkinje cells and olive neurones in the normal and Lurcher mutant mouse. *Brain Research* 111:396–398.
- Caddy K, and Biscoe T. 1979. Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 287:167–201.
- Ciani C, Doty S, and Fritton S. 2005. Mapping bone interstitial fluid movement: displacement of ferritin tracer during histological processing. *Bone* 37:379–387.

- Ciani C, Doty S, and Fritton S. 2009. An effective histological staining process to visualize bone interstitial fluid space using confocal microscopy. *Bone* 44:1015–1017.
- Cooper R, and Milgram J. 1966. Morphology of the osteon: an electron microscopic study. *Journal of Bone and Joint Surgery* 48:1239–1271.
- Cowin S. 2002. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 2:256–260.
- Cowin S, Moss-Slentijn L, and Moss M. 1991. Candidates for the mechanosensory system in bone. *Journal of Biomechanical Engineering* 113:191–197.
- Demes B, Qin Y-X, Stern J, Larson S, and Rubin C. 2001. Patterns of strain in the macaque tibia during functional activity. *American Journal of Physical Anthropology* 116:257–265.
- Dodd J, Raleigh J, and Gross T. 1999. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway. *American Physiological Society* 277:598–602.
- Exner G, and Prader M. 1979. Bone densitometry using computed tomography. Part I: selective determination of trabecular bone density and other bone mineral parameters. Normal values in children and adults. *British Journal of Radiology* 52:14–23.
- Fritton JC, Myers ER, Wright TM, and van der Meulen MCH. 2005. Loading induces site-specific increases in mineral content assessed by microcomputed tomography of the mouse tibia. *Bone* 36:1030–1038.
- Frost HM. 1987. Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *The Anatomical Record* 219:1–9.
- Frost HM. 2001. From Wolff’s law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *The Anatomical Record* 262:398-419.
- Haapasalo H, Sievanen H, Kannus P, Heinonen A, Pekka O, and Vuori I. 1996. Dimensions and estimated mechanical characteristics of the humerus after long-term tennis loading. *Journal of Bone and Mineral Research* 11:864–872.

- Hall C. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 18:385–403.
- Hartmann N, Martrette J-M, and Westphal A. 2001. Influence of the Lurcher mutation on myosin heavy chain expression in skeletal and cardiac muscles. *Journal of Cellular Biochemistry* 81:222–231.
- Heřt J, Fiala P, and Petrářl M. 1994. Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* 15:269–277.
- Hillsley M, and Frangos J. 1993. Review: bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnology and Bioengineering* 43:573–581.
- Huiskes R. 1982. On the modeling of long bones in structural analyses. *Journal of Biomechanics* 15:65–69.
- Huiskes R. 2000. If bone is the answer, then what is the question? *Journal of Anatomy* 197:145–156.
- Kemsley W, Billewicz W, and Thomson A. 1962. A new weight-for-height standard based on british anthropometric data. *British Journal of Preventive and Social Medicine* 16:189.
- Klein-Nulend J, Nijweide P, and Burger E. 2003. Osteocyte and bone structure. *Current Science* 1:5–10.
- KnotheTate ML, and Knothe U. 2000. An ex vivo model to study transport processes and fluid flow in loaded bone. *Journal of Biomechanics* 33:247–254.
- Křížková A, and Vořeh F. 2004. Development of early motor learning and topical motor skills in a model of cerebellar degeneration. *Behavioral Brain Research* 150:65–72.
- Lalonde R, Botez MI, Joyal CC, and Caumartin M. 1992. Motor abnormalities in Lurcher mutant mice. *Physiology and Behavior* 51:523–525.
- Lanyon L, and Baggott D. 1976. Mechanical function as an influence on the structure and form of bone. *Journal of Bone and Joint Surgery* 58-B:436–443.

- Lanyon L, and Rubin C. 1984. Static vs. dynamic loads as an influence on bone remodeling. *Journal of Biomechanics* 17:897–905.
- Larsen C. 1999. *Bioarcheology: interpreting behavior from the human skeleton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lieberman D. 1996. How and why humans grow thin skulls: experimental evidence for systemic cortical robusticity. *American Journal of Physical Anthropology* 101:217–236.
- Lieberman D, Pearson O, Polk J, Demes B, and Crompton A. 2003. Optimizing of bone growth and remodeling in response to loading in tapered mammalian limbs. *The Journal of Experimental Biology* 206:3125–3138.
- Lieberman DE, Polk JD, and Demes B. 2004. Predicting long bone loading from cross-sectional geometry. *American Journal of Physical Anthropology* 123:156–171.
- Lovejoy C, McCollum M, Reno P, and Rosenman B. 2003. Developmental biology and human evolution. *Annual Review of Anthropology* 32:85–109.
- Meloun M, and Militký J. 1998. *Statistické zpracování experimentálních dat*. Praha: Plus.
- Mikic B, Van der Meulen M, Kingsley D, and Carter D. 1995. Long bone geometry and strength in adult BMP-5 deficient mice. *Bone* 16:445–454.
- Nicolella DP, Moravits D, Gale A, Bonewald L, and Lankford J. 2006. Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *Journal of Biomechanics* 39:1735–1743.
- Nigg B, and Herzog W. 2006. *Biomechanics of the musculo-skeletal system*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Nordin M, and Frankel VH. 2001. *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- O’Neill MC, and Ruff CB. 2004. Estimating human long bone cross-sectional geometric properties: a comparison of noninvasive methods. *Journal of Human Evolution* 47:221–235.

- Pearson O, and Lieberman D. 2004. The aging of Wolff's "law": ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *Yearbook of Physical Anthropology* 47:63–99.
- Petrtyl M, Heřt J, and Fiala P. 1999. Spatial organization of the haversian bone in man. *Journal of Biomechanics* 29:161–167.
- Phillips R. 1960. Lurcher, a new gene in linkage group XI of the house mouse. *Journal of Genetics* 57:35–42.
- Piekarski K, and Munro M. 1997. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 269:80–82.
- Preacher K, and Briggs N. 2001. Calculation for Fisher's exact test: an interactive calculation tool for Fisher's exact probability test for 2 x 2 tables.
- Rauch F, Klein K, Allolio B, and Schonau E. 1999. Age at menarche and cortical bone geometry in premenopausal women. *Bone* 25:69–73.
- Rittweger J, Goosey-Tolfrey V, Cointry G, and Ferretti JL. 2010. Structural analysis of the human tibia in men with spinal cord injury by tomographic (pQCT) serial scans. *Bone* 47:511–518.
- Robling A, Hinant F, Burr D, and Turner C. 2002. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:1545–1554.
- Roux W. 1881. *Der kampf der teile im organismus*. Leipzig: Engelmann.
- Roy TA, Ruff CB, and Plato CC. 1994. Hand dominance and bilateral asymmetry in the structure of the second metacarpal. *American Journal of Physical Anthropology* 94:203–211.
- Ruff CB. 2000. Body size, body shape, and long bone strength in modern humans. *Journal of Human Evolution* 38:269–290.
- Ruff CB. 2002. Variation in human body size and shape. *Annual Review of Anthropology* 31:211–32.

- Ruff CB. 2007. Biomechanical analyses of archaeological human skeletons. In: *Biological anthropology of the human skeleton*. New York: Wiley-Liss, Inc. 183–206.
- Ruff CB, and Hayes W. 1983. Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae: a biomechanical investigation. I. Method and general patterns of variation. *American Journal of Physical Anthropology* 60:359–381.
- Ruff CB, Larsen CS, and Hayes WC. 1984. Structural changes in the femur with the transition to agriculture on the Georgia coast. *American Journal of Physical Anthropology* 64:125–136.
- Ruff CB, Trinkaus E, Walker A, and Larsen CS. 1993. Postcranial robusticity in Homo. I: temporal trends and mechanical interpretation. *American Journal of Physical Anthropology* 91:21–53.
- Ruff CB, Walker A, and Trinkaus E. 1994. Postcranial robusticity in Homo. III: ontogeny. *American Journal of Physical Anthropology* 93:35–54.
- Ruff CB, Holt B, and Trinkaus E. 2006. Who’s afraid of the big bad Wolff?: “Wolff’s Law” and bone functional adaptation. *American Journal of Physical Anthropology* 129:484–498.
- Sample S, Behan M, Smith L, Oldenhoff W, Markel M, Kalscheur V, Hao Z, Miletic V, and Muir P. 2008. Functional adaptation to loading of a single bone is neuronally regulated and involves multiple bones. *Journal of Bone and Mineral Research* 23:1372–1381.
- Schmitt D, Churchill SE, and Hylander WL. 2003. Experimental evidence concerning spear use in Neandertals and early modern human. *Journal of Archaeological science* 30:103–114.
- Sládek V, Galeta P, and Sosna D. submitted. Measuring human remains in the field: grid technique, total station, or microscribe? *Forensic Science International*: submitted.
- Sládek V, Berner M, and Sailer R. 2006a. Mobility in Central European Late Eneolithic and Early Bronze Age: tibial cross-sectional geometry. *Journal of Archaeological science* 33:470–482.

- Sládek V, Berner M, and Sailer R. 2006b. Mobility in Central European Late Eneolithic and Early Bronze Age: femoral cross-sectional geometry. *American Journal of Physical Anthropology* 130:320–332.
- Sládek V, Berner M, Sosna D, and Sailer R. 2007. Human manipulative behavior in the Central European Late Eneolithic and Early Bronze Age: humeral bilateral asymmetry. *American Journal of Physical Anthropology* 133:669–681.
- Sládek V, Berner M, Galeta P, Friedl L, and Kudrnová Š. 2010. Technical note: the effect of midshaft location on the error ranges of femoral and tibial cross-sectional parameters. *American Journal of Physical Anthropology* 141:325–332.
- Sone T, Imai Y, Joo Y, Onodera S, Tomomitsu T, and Fukunaga M. 2006. Side-to-side differences in cortical bone mineral density of tibiae in young male athletes. *Bone* 38:708–713.
- De Souza R, Matsuura M, Eckstein F, Rawlinson S, Lanyon L, and Pitsillides A. 2005. Non-invasive axial loading of mouse tibiae increases cortical bone formation and modifies trabecular organization: a new model to study cortical and cancellous compartments in a single loaded element. *Bone* 37:810–818.
- Sugiyama T, Price J, and Lanyon L. 2010. Functional adaptation to mechanical loading in both cortical and cancellous bone is controlled locally and is confined to the loaded bones. *Bone* 46:314–321.
- Tommasini SM, Nasser P, and Jepsen KJ. 2007. Sexual dimorphism affects tibia size and shape but not tissue-level mechanical properties. *Bone* 40:498–505.
- Trinkaus E, Stringer CB, Ruff CB, Hennessy RJ, Roberts MB, and Parfitt SA. 1999. Diaphyseal cross-sectional geometry of the Boxgrove 1 Middle Pleistocene human tibia. *Journal of Human Evolution* 37:1–25.
- Trinkaus E, Ruff C, and Churchill S. 2002. Upper limb versus lower limb loading patterns among Near Eastern Middle Paleolithic hominids. In: *Neandertals and modern humans in Western Asia*. Springer US. 391–404.
- Turner C, and Robling A. 2003. Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 31:45–50.

- Wang N, Butler J, and Ingber D. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124–1127.
- Weiss E. 2003. Effects of rowing on humeral strength. *American Journal of Physical Anthropology* 121:293–302.
- Wetts R, and Herrup K. 1982. Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in Lurcher chimeric mice. II. Granule cell death. *Brain Research* 250:358–362.
- Wetzsteon R, Hughes J, Kaufman B, Vazyuez G, Stoffregen T, Stovitz S, and Petit M. 2009. Ethnic differences in bone geometry and strength are apparent in childhood. *Bone* 44:970–975.
- Wilks D, Winwood K, Gilliver S, Kwiet A, Chatfield M, Michaelis I, Sun L, Ferretti J, Sargeant A, Felsenberg D, et al. 2009. Bone mass and geometry of the tibia and the radius of master sprinters, middle and long distance runners, race-walkers and sedentary control participants: a pQCT study. *Bone* 45:91–97.
- Wolff J. 1892. *Das gesetz der transformation der knochen*. Berlin: A. Hirschwild.
- Zhang D, Weinbaum S, and Cowin SC. 1998. On the calculation of bone pore water pressure due to mechanical loading. *International Journal of Solids and Structures* 35:4981–4997.
- Zhang P, Su M, Liu Y, Hsu A, and Yokota H. 2007. Knee loading dynamically alters intramedullary pressure in mouse femora. *Bone* 40:538–543.
- Zuo J, Philip L, Jager P, Takahashi K, Jiang W, Linden D, and Heintz N. 1997. Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in $\delta 2$ glutamate receptor gene. *Nature* 388:769–773.

Přílohy: Tabulky

Tab. 1: Testy motorických vlastností jedinců typu Lurcher a kontroly.

Tab. 2: Test intraobservační chyby prvního až osmého opakovaného měření (1–8) hodnoty celkové plochy průřezu (TA) u deseti testovaných jedinců.

Tab. 3: Test intraobservační chyby prvního až osmého opakovaného měření (1–8) hodnoty polárního momentu plochy průřezu (J) u deseti testovaných jedinců.

Tab. 4: Průměr a SD hodnoty u hmotnosti, biomechanické délky a parametrů CSG jedinců typu Lurcher a kontroly.

Tab. 1: Testy motorických vlastností jedinců typu Lurcher a kontroly¹

Parametr	Lurcher	Kontrola	P-value
Hrazda [s]	23,67	41,08	0,005**
Rotarod [s]	3,67	54,78	0,0003***
Open field dráha [cm]	1047,19	1012,12	0,967
Open field pohyb [s]	154,80	140,03	0,775
Open field hybnost [s]	2,52	0,20	0,006**
Open field rychlost [cm/s]	7,43	7,19	0,596

¹ Data převzata z dosud nepublikovaných výsledků (GAUK 408911; řešitel J. Tůma).

² *P-value* dle Mann-Whitney testu; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tab. 2: Test intraobservační chyby prvého až osmého opakovaného měření (1–8)¹ hodnoty celkové plochy průřezu (TA) u deseti testovaných jedinců

Jedinec	TA [mm ²]	1–8 [mm ²]	2–8 [mm ²]	3–8 [mm ²]	4–8 [mm ²]	5–8 [mm ²]	6–8 [mm ²]	7–8 [mm ²]
1	1,357	-0,0338	-0,0331	-0,0291	-0,0291	-0,0303	-0,0045	-0,0020
2	1,273	0,0136	0,0007	0,0049	0,0175	0,0109	0,0085	0,0051
3	1,271	0,0004	-0,0079	-0,0001	0,0091	-0,0029	0,0057	0,0033
4	1,134	-0,0094	-0,0138	-0,0029	0,0063	-0,0018	-0,0024	-0,0001
5	1,276	-0,0038	0,0051	0,0016	-0,0024	0,0085	-0,0003	0,0157
6	1,206	-0,0174	-0,0067	0,0020	-0,0002	0,0001	-0,0077	0,0031
7	1,282	0,0255	0,0189	0,0306	0,0101	0,0302	0,0092	0,0094
8	1,050	0,0158	0,0113	0,0209	0,0103	0,0086	0,0113	0,0091
9	1,235	0,1546	0,0171	0,0095	0,0083	0,0121	0,0080	0,0218
10	1,128	-0,0345	-0,0470	0,0107	-0,0048	0,0176	0,0287	0,0178
MD ²		0,0111	-0,0055	0,0048	0,0025	0,0053	0,0056	0,0083
MAD ³		0,0309	0,0162	0,0112	0,0098	0,0123	0,0086	0,0087
95% LA ⁴		-0,090; 0,112	-0,045; 0,034	-0,025; 0,034	-0,022; 0,027	-0,024; 0,035	-0,014; 0,025	-0,006; 0,023

¹ 1–8: 1. až 7. měření hodnoty J jsme srovnávali s hodnotou 8. měření. Osmé měření jsme zvolili jako referenční údaj (detaily jsou v metodách).

² MD (*mean difference*): Průměrná odchylka mezi jednotlivými měřeními (Sládek et al., 2010; detaily výpočtu jsou v metodách).

³ MAD (*mean absolute difference*): Absolutní průměrná odchylka mezi jednotlivými měřeními (Sládek et al., 2010; detaily výpočtu jsou v metodách).

⁴ 95% LA (limits of agreement): Horní a dolní 95% limity shody pro MD (Bland and Altman, 1986; detaily výpočtu jsou v metodách).

Tab. 3: Test intraobservační chyby prvého až osmého opakovaného měření (1–8)¹ hodnoty polárního momentu plochy průřezu (J) u deseti testovaných jedinců

Jedinec	J [mm ⁴]	1–8 [mm ⁴]	2–8 [mm ⁴]	3–8 [mm ⁴]	4–8 [mm ⁴]	5–8 [mm ⁴]	6–8 [mm ⁴]	7–8 [mm ⁴]
1	1,357	-0,0155	-0,0145	-0,0138	-0,0133	-0,0138	-0,0017	-0,0016
2	1,273	0,0070	0,0012	0,0030	0,0083	0,0057	0,0047	0,0029
3	1,271	-0,0002	-0,0042	0,0004	0,0042	-0,0010	0,0030	0,0021
4	1,134	-0,0029	-0,0045	-0,0001	0,0036	-0,0007	0,0003	0,0008
5	1,276	-0,0042	0,0016	0,0002	-0,0023	0,0018	0,0002	0,0064
6	1,206	-0,0075	-0,0030	0,0007	-0,0002	-0,0001	-0,0040	0,0011
7	1,282	0,0087	0,0056	0,0117	0,0020	0,0095	0,0018	0,0030
8	1,050	0,0056	0,0042	0,0068	0,0039	0,0030	0,0042	0,0030
9	1,235	0,0083	0,0076	0,0052	0,0049	0,0060	0,0046	0,0103
10	1,128	-0,0148	-0,0194	0,0035	-0,0021	0,0070	0,0110	0,0061
MD ²		-0,0016	-0,0025	0,0018	0,0009	0,0017	0,0024	0,0034
MAD ³		0,0075	0,0066	0,0045	0,0044	0,0049	0,0036	0,0037
95% LA ⁴		-0,018; 0,015	-0,019; 0,014	-0,011; 0,014	-0,010; 0,012	-0,010; 0,012	-0,005; 0,010	-0,003; 0,010

¹ 1–8: 1. až 7. měření hodnoty J jsme srovnávali s hodnotou 8. měření. Osmé měření jsme zvolili jako referenční údaj (detaily jsou v metodách).

² MD (*mean difference*): Průměrná odchylka mezi jednotlivými měřeními (Sládek et al., 2010; detaily výpočtu jsou v metodách).

³ MAD (*mean absolute difference*): Absolutní průměrná odchylka mezi jednotlivými měřeními (Sládek et al., 2010; detaily výpočtu jsou v metodách).

⁴ 95% LA (limits of agreement): Horní a dolní 95% limity shody pro MD (Bland and Altman, 1986; detaily výpočtu jsou v metodách).

Tab. 4: Průměr a SD hodnoty u hmotnosti, biomechanické délky a parametrů CSG jedinců typu Lurcher a kontroly

Parametr ¹	Lurcher (n = 10)	Kontrola (n = 10)	P-value ²
Hmotnost [g]	28,70 ± 0,241	27,95 ± 0,380	0,68
BML [mm]	17,49 ± 0,233	17,64 ± 0,021	0,33
TA	1,187 ± 0,011	1,232 ± 0,008	0,37
CA	0,752 ± 0,006	0,775 ± 0,006	0,52
I _{max}	0,116 ± 0,002	0,123 ± 0,002	0,55
I _{min}	0,089 ± 0,001	0,096 ± 0,001	0,27
J	0,205 ± 0,003	0,219 ± 0,003	0,41
TA adj.	0,0418 ± 0,0003	0,0449 ± 0,0006	0,27
CA adj.	0,0265 ± 0,0002	0,0283 ± 0,0004	0,38
I _{max} adj.	0,00023 ± 0,000004	0,00025 ± 0,000004	0,34
I _{min} adj.	0,00018 ± 0,000002	0,00020 ± 0,000004	0,22
J adj.	0,00041 ± 0,000006	0,00045 ± 0,000008	0,27
I _{max} /I _{min}	1,303 ± 0,013	1,273 ± 0,009	0,65

¹ BML, biomechanická délka; TA, celková plocha průřezu; CA, plocha hutné kostní tkáně; I_{max}, maximální kvadratické momenty plochy průřezu; I_{min}, minimální kvadratické momenty plochy průřezu; J, polární kvadratický moment plochy průřezu. Délka tibie je vyjádřena v mm, hmotnost je v g, plošné parametry jsou v mm² a kvadratické momenty v mm⁴. Plochy průřezu jsou standardizovány hmotností, kvadratické momenty jsou standardizovány součinem hmotností a biomechanické délky kosti.

² *P-value* dle dvouvýběrového t-testu.

Přílohy: Grafy

Graf 1: Hmotnost jedinců skupiny Lurcher a kontroly.

Graf 2: Biomechanická délka (BML) tibie skupiny Lurcher a kontroly.

Graf 3: Biomechanická délka (BML) tibie vztažená ke hmotnosti jedince.

Graf 4: Celková plocha průřezu (TA) vztažená ke hmotnosti jedince.

Graf 5: Plocha hutné kostní tkáně (CA) vztažená ke hmotnosti jedince.

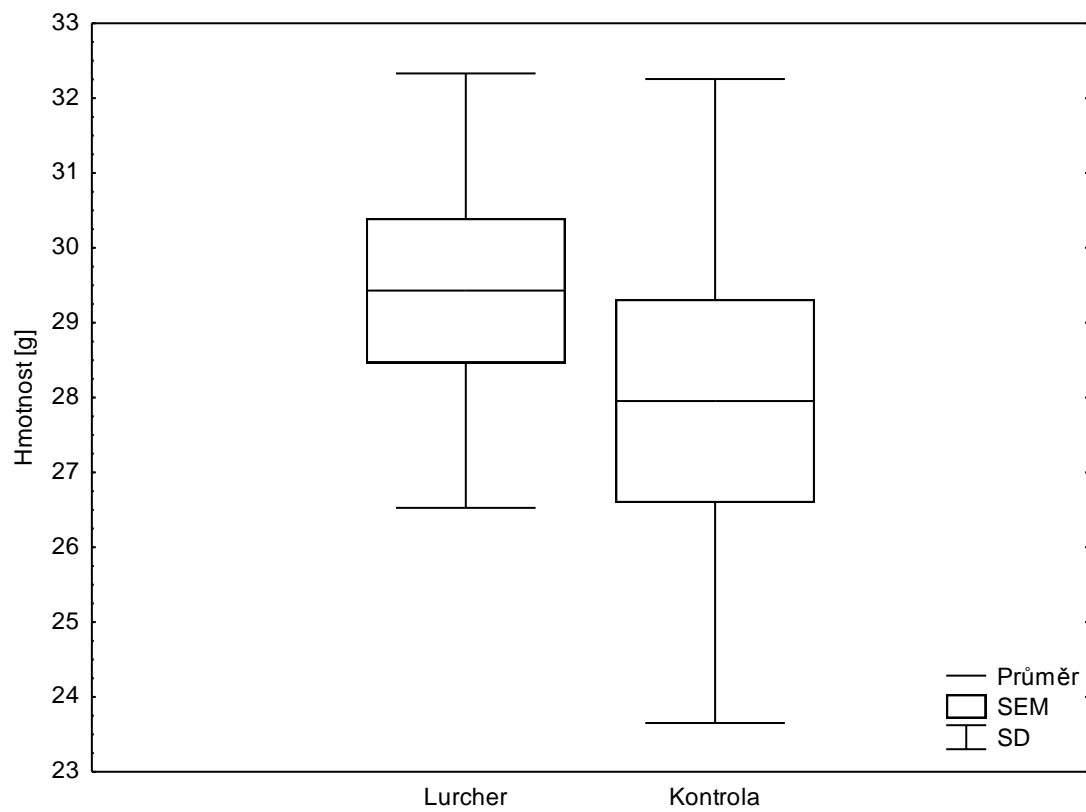
Graf 6: Polární kvadratický moment plochy průřezu (J) tibie vztažený k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie.

Graf 7: Maximální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{\max}) tibie vztažené k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie.

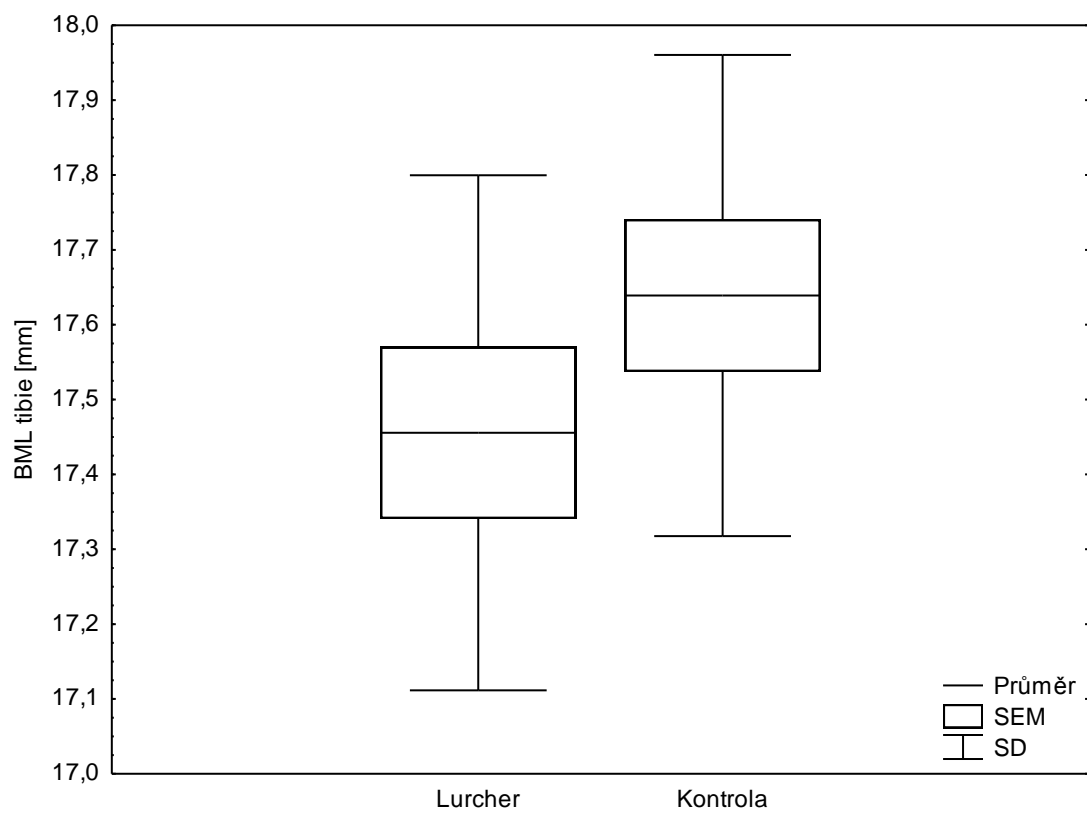
Graf 8: Minimální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{\min}) tibie vztažené k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie.

Graf 9: Maximální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{\max}) tibie vztažené k minimálním kvadratickým momentům plochy průřezu (I_{\min}).

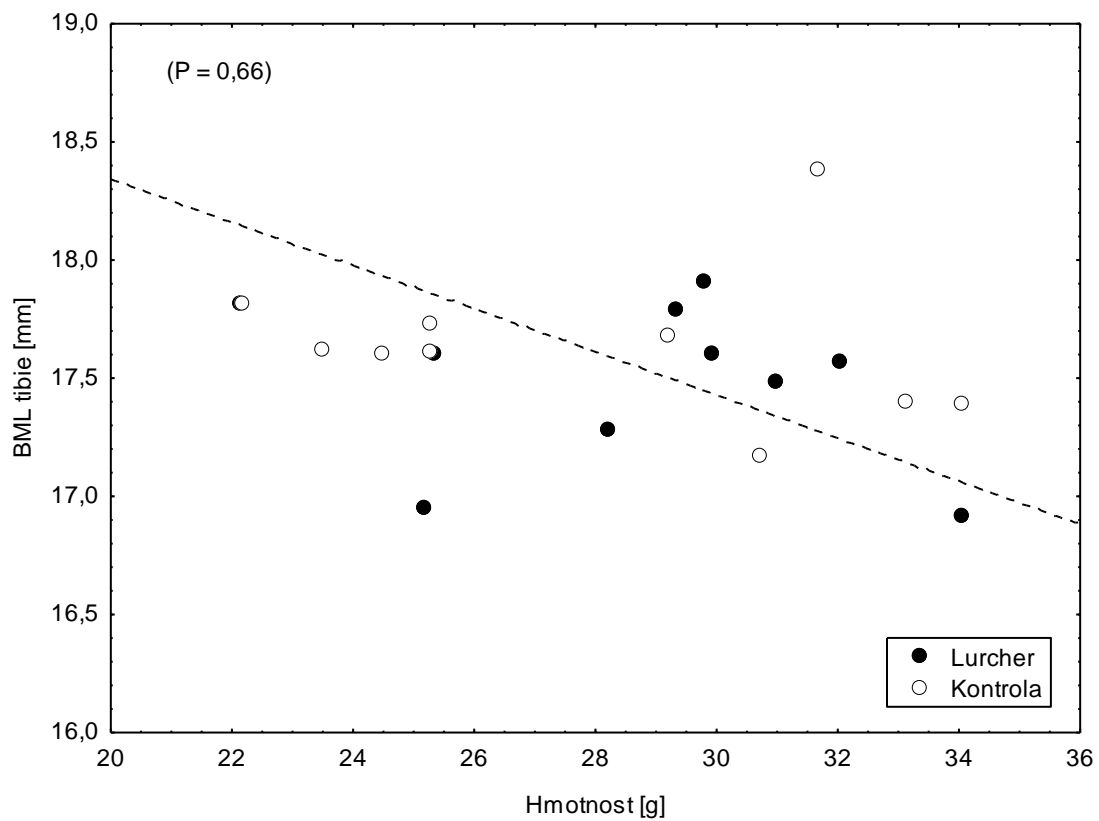
Graf 10: Dosažená úroveň a potenciál fyzické aktivity jedinců ovlivňující parametry CSG.



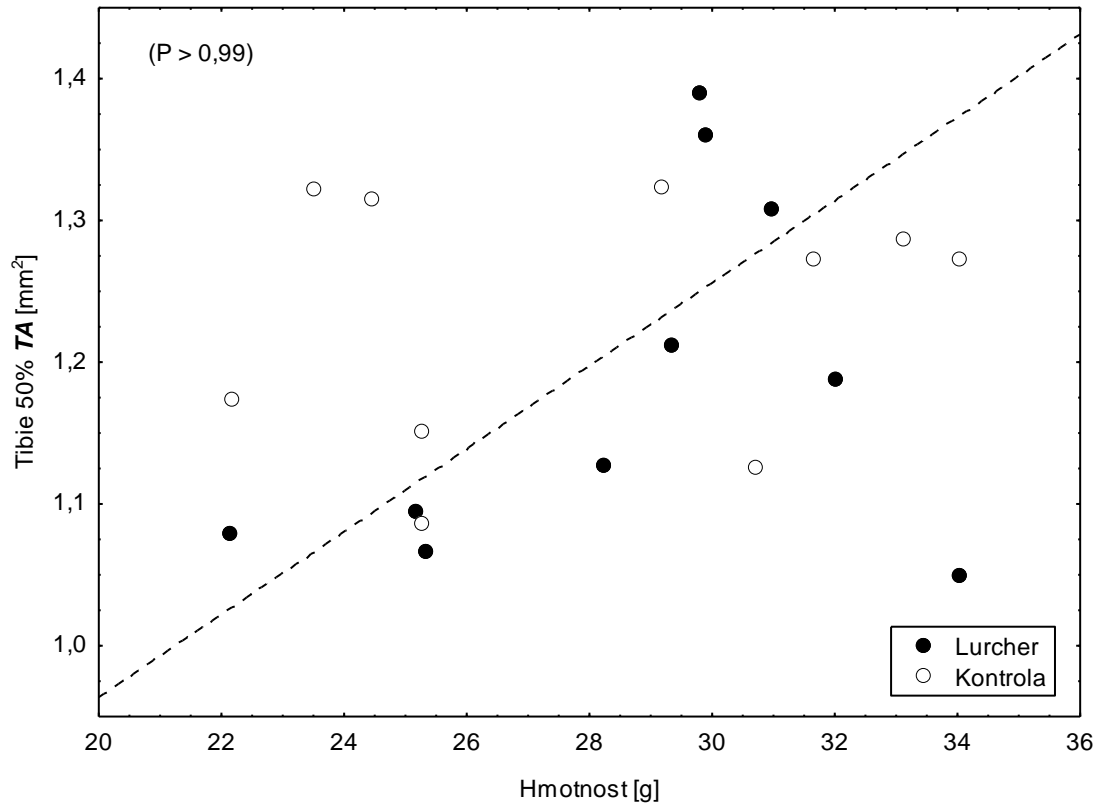
Graf 1: Hmotnost jedinců skupiny Lurcher a kontroly.



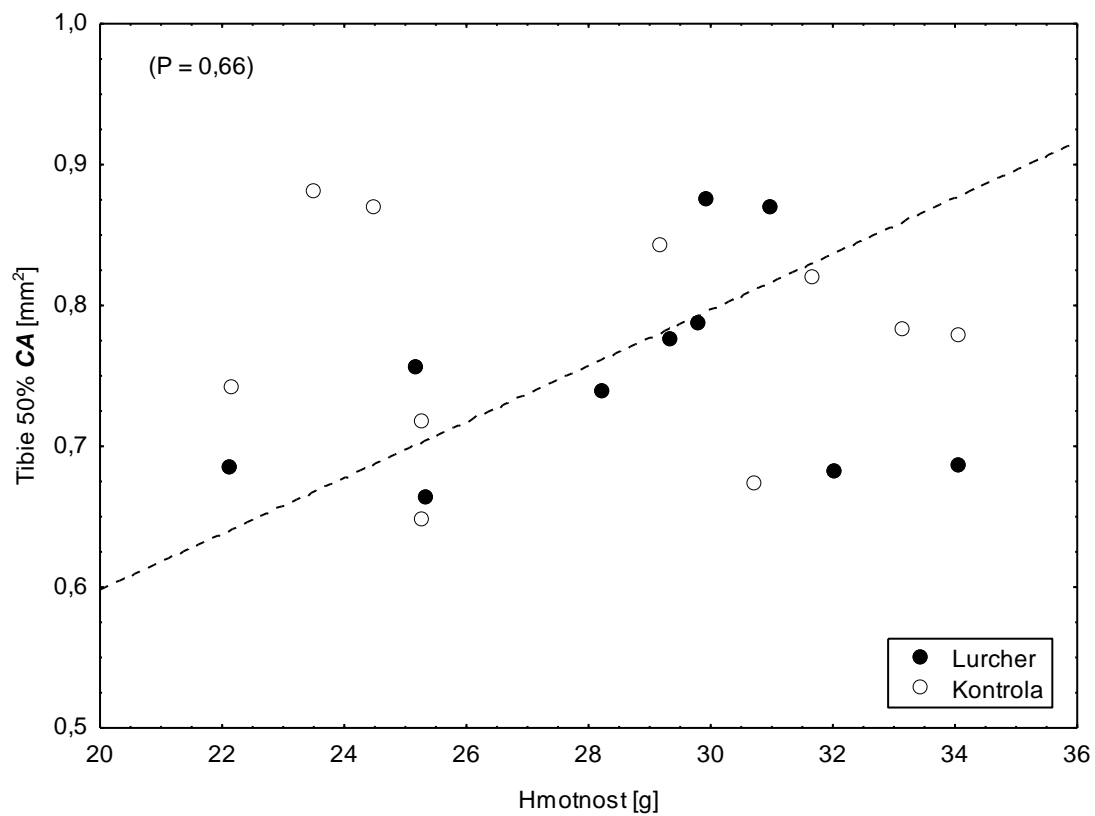
Graf 2: Biomechanická délka (BML) tibie skupiny Lurcher a kontroly.



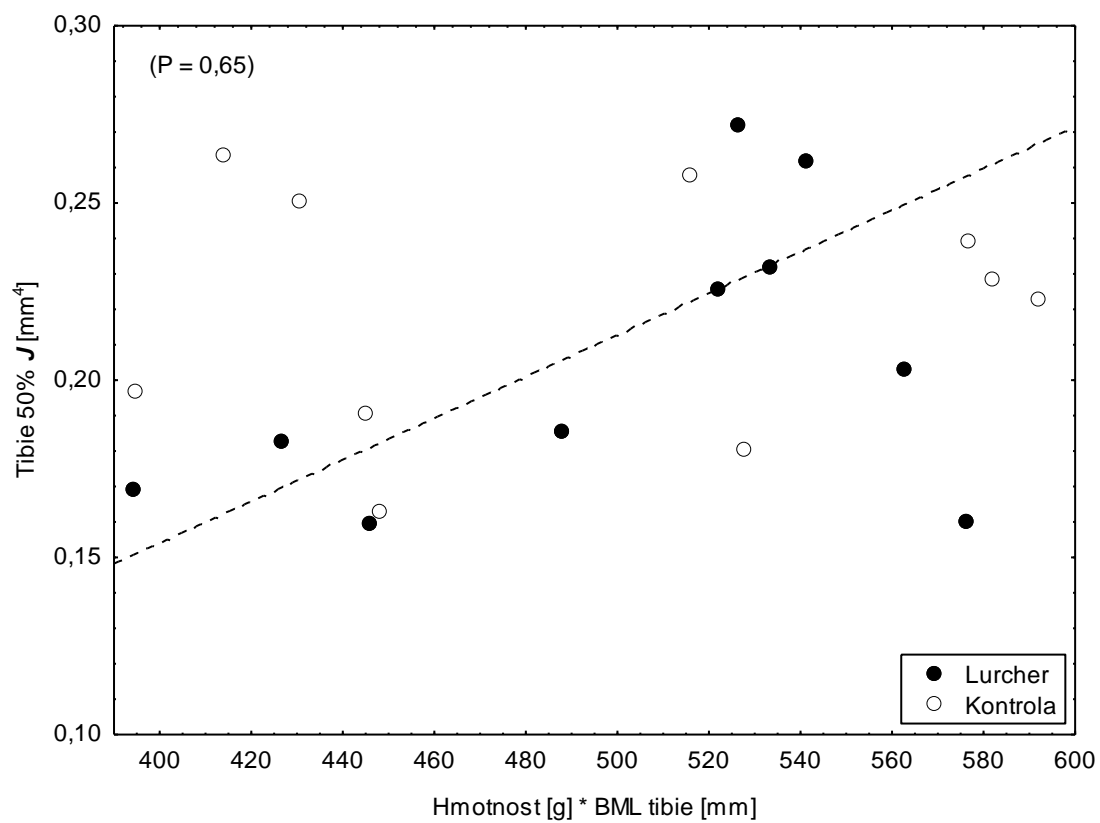
Graf 3: Biomechanická délka (BML) tibie vztažená ke hmotnosti jedince. V grafu je vynesena redukovaná hlavní osa (RMA) a vyjádřena hodnota pravděpodobnosti (P) Fisherova exaktního testu.



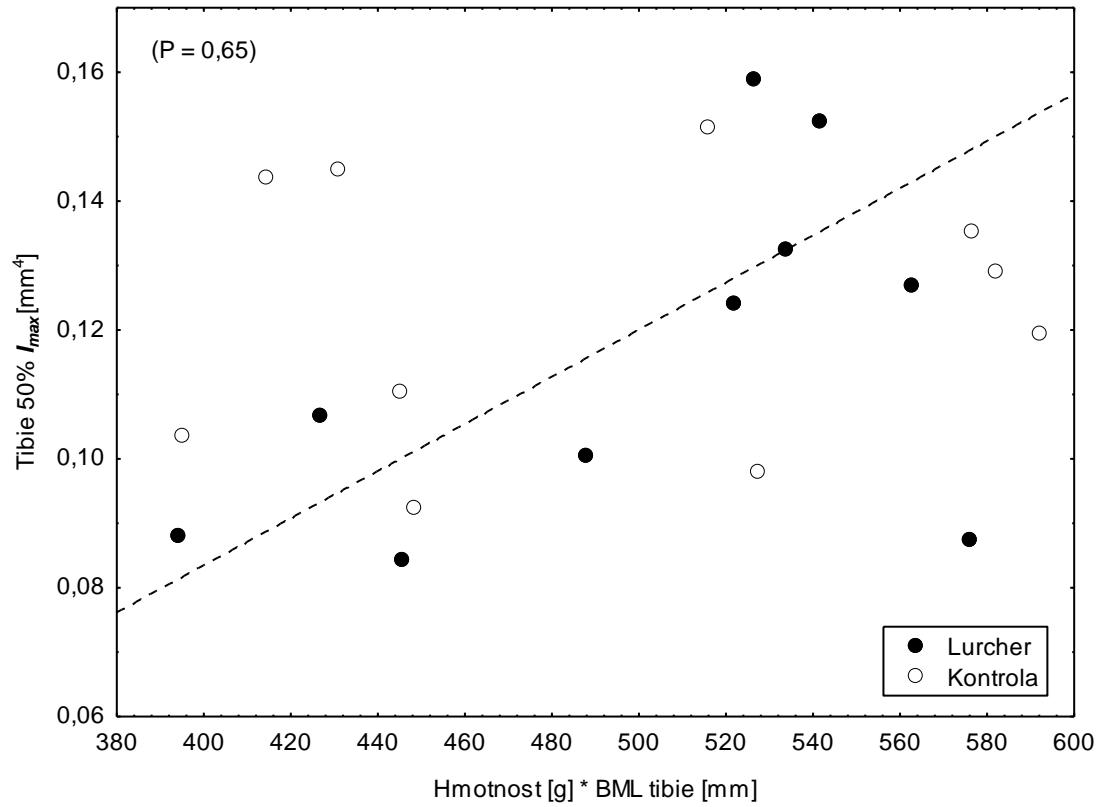
Graf 4: Celková plocha průřezu (TA) vztažená ke hmotnosti jedince. Popis je u Grafu 3.



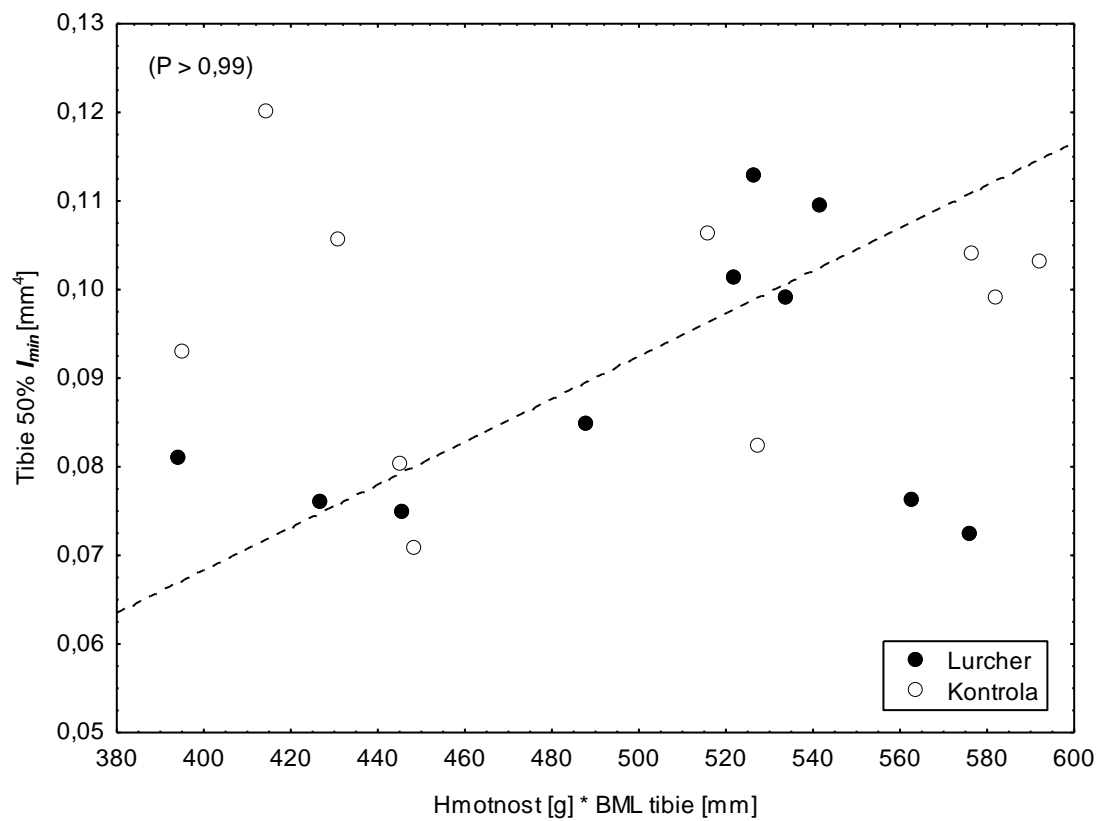
Graf 5: Plocha hutné kostní tkáně (CA) vztažená ke hmotnosti jedince. Popis je u Grafu 3.



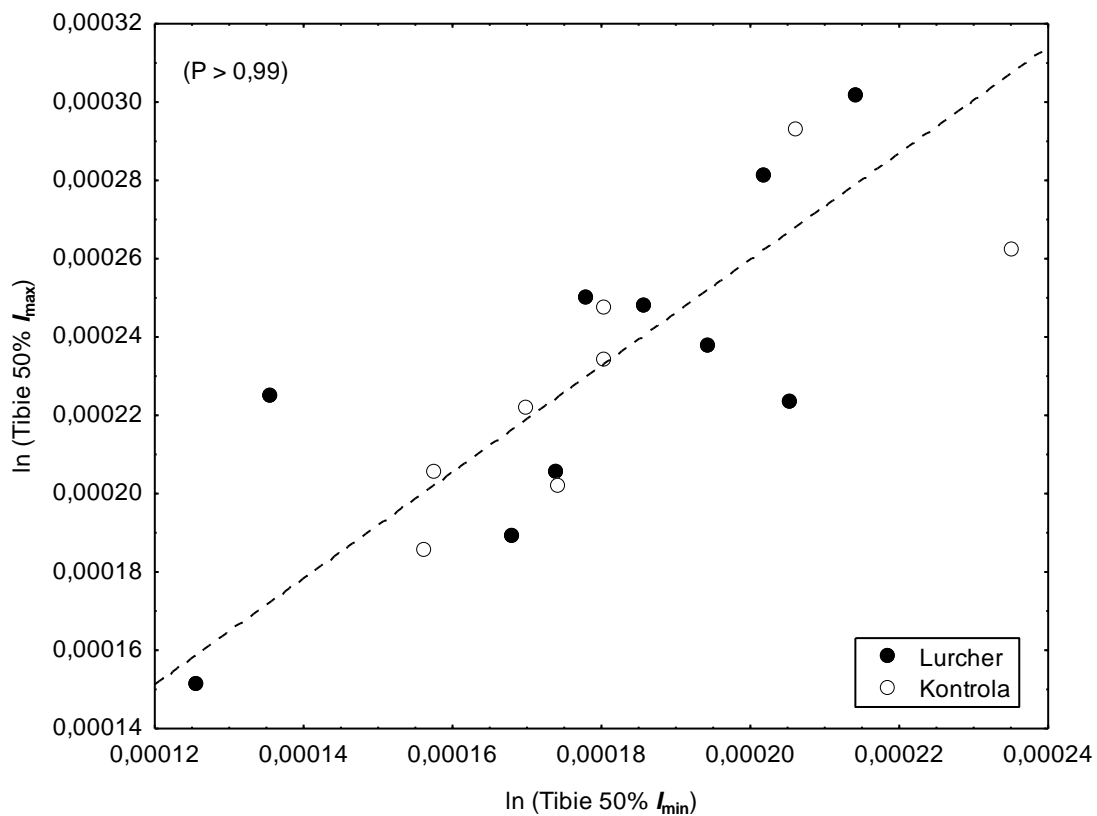
Graf 6: Polární kvadratický moment plochy průřezu (J) tibie vztažený k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie. Popis je u Grafu 3.



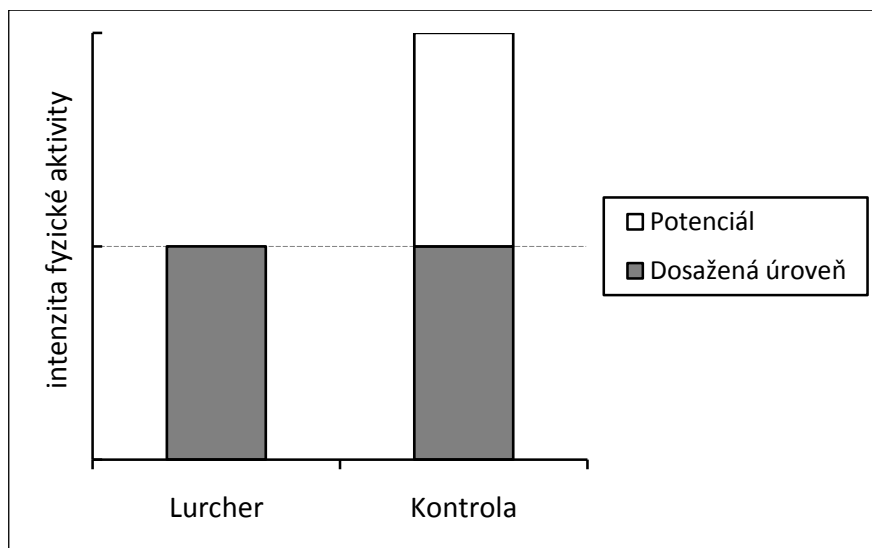
Graf 7: Maximální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{max}) tibie vztažené k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie. Popis je u Grafu 3.



Graf 8: Minimální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{min}) tibie vztažené k součinu hmotnosti a biomechanické délky (BML) tibie. Popis je u Grafu 3.



Graf 9: Maximální kvadratické momenty plochy průřezu (I_{max}) tibie vztažené k minimálním kvadratickým momentům plochy průřezu (I_{min}). Popis je u Grafu 3.



Graf 10: Dosažená úroveň a potenciál intenzity fyzické aktivity jedinců ovlivňující parametry CSG.

Přílohy: Obrázky

Obr. 1: Transverzální průřez těla tibie.

Obr. 2: Struktura lakuno-kanalikulární porozity hutné kostní tkáně u myši.

Obr. 3: Napěťově-deformační křivka (upraveno podle Nordin and Frankel, 2001).

Obr. 4: Model jednoduché zpětné vazby funkční adaptace kosti (upraveno podle Ruff et al., 2006; Lanyon, 1982).

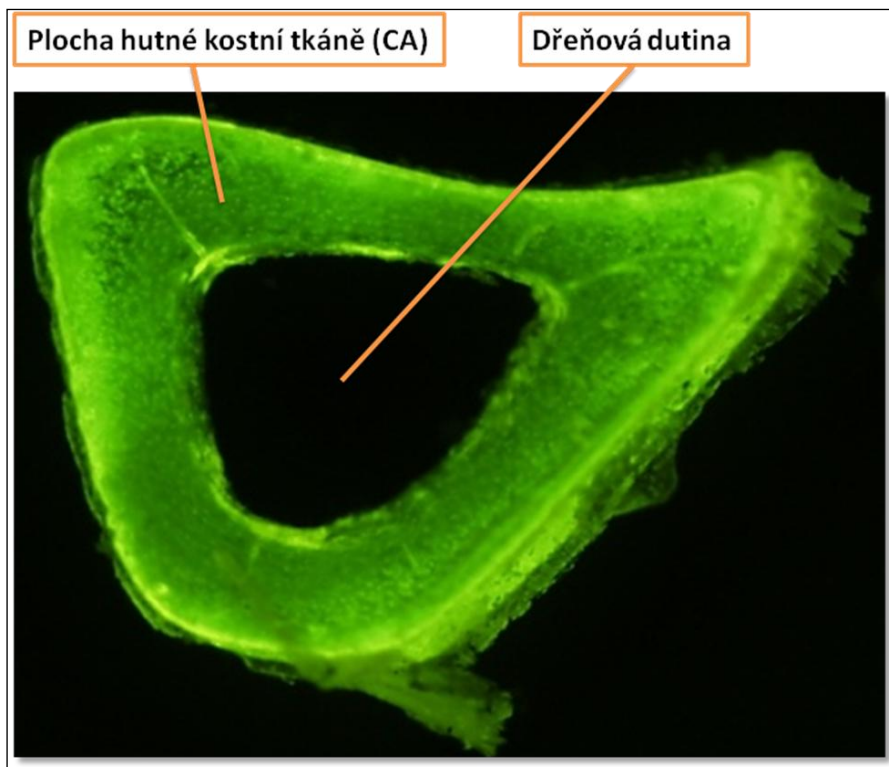
Obr. 5: Typy zátěže působící na kost (upraveno podle Nordin and Frankel, 1980).

Obr. 6: Změny ve tvaru transverzálního průřezu těla femuru způsobené přechodem k zemědělství na pobřeží Georgie, USA (upraveno podle Ruff et al., 1984).

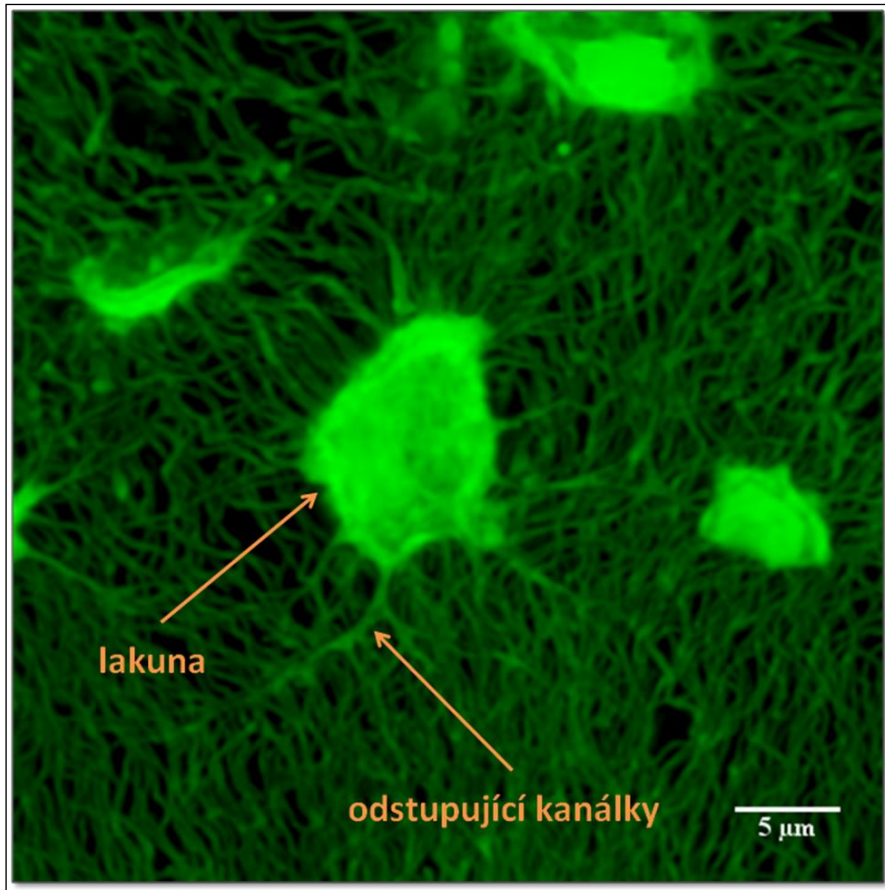
Obr. 7: Tibie – transverzální průřez byl veden v 50 % biomechanické délky kosti.

Obr. 8: Pila s diamantovým kotoučem Isomet 1000 (Buehler Ltd.).

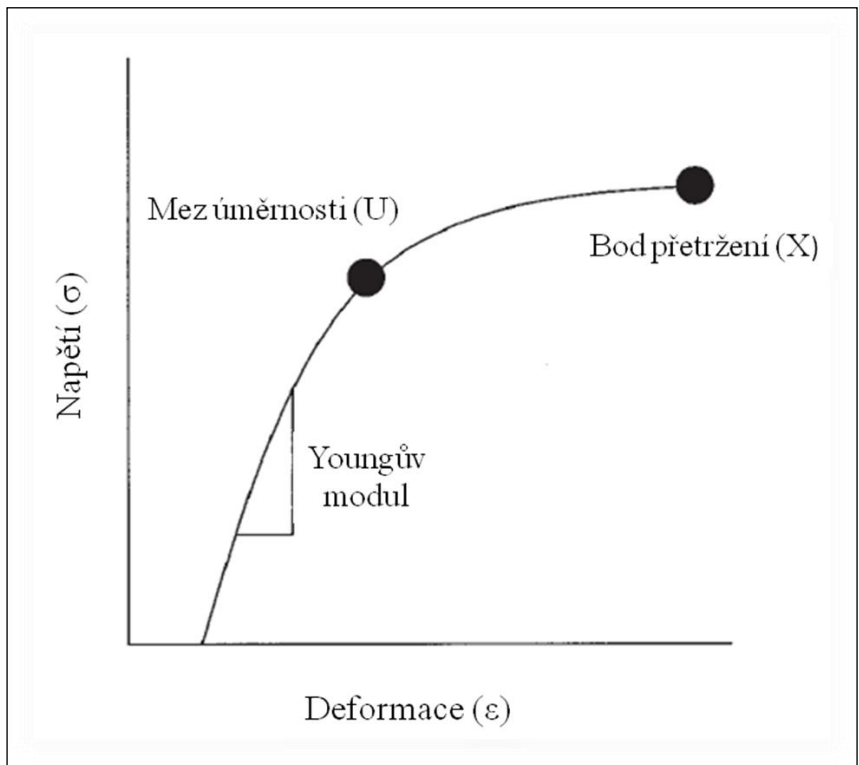
Obr. 9: CSG analýza v programu ImageJ.



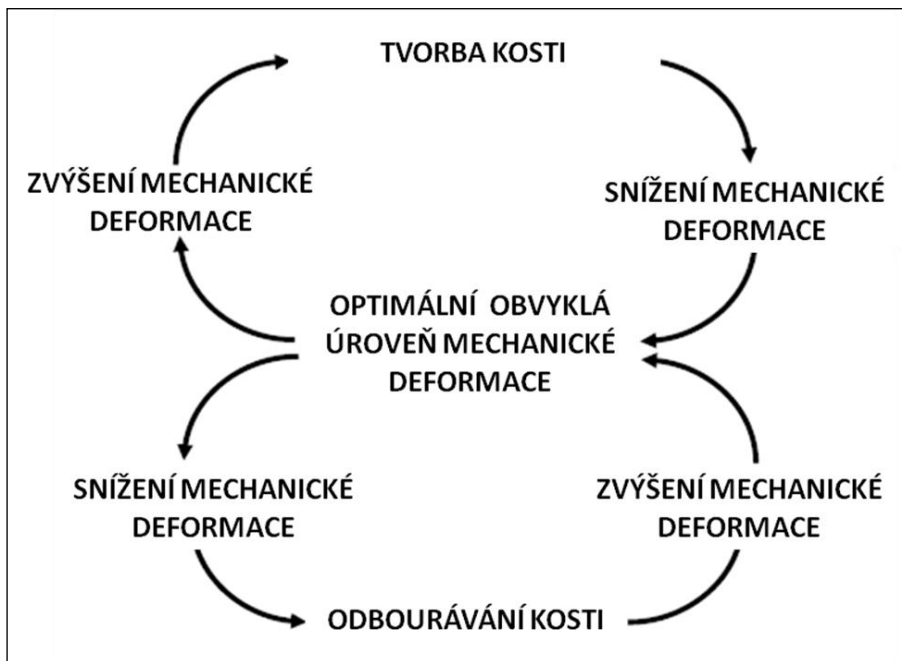
Obr. 1: Transverzální průřez těla tibie, označená je plocha hutné kostní tkáně a dřeňové dutiny.



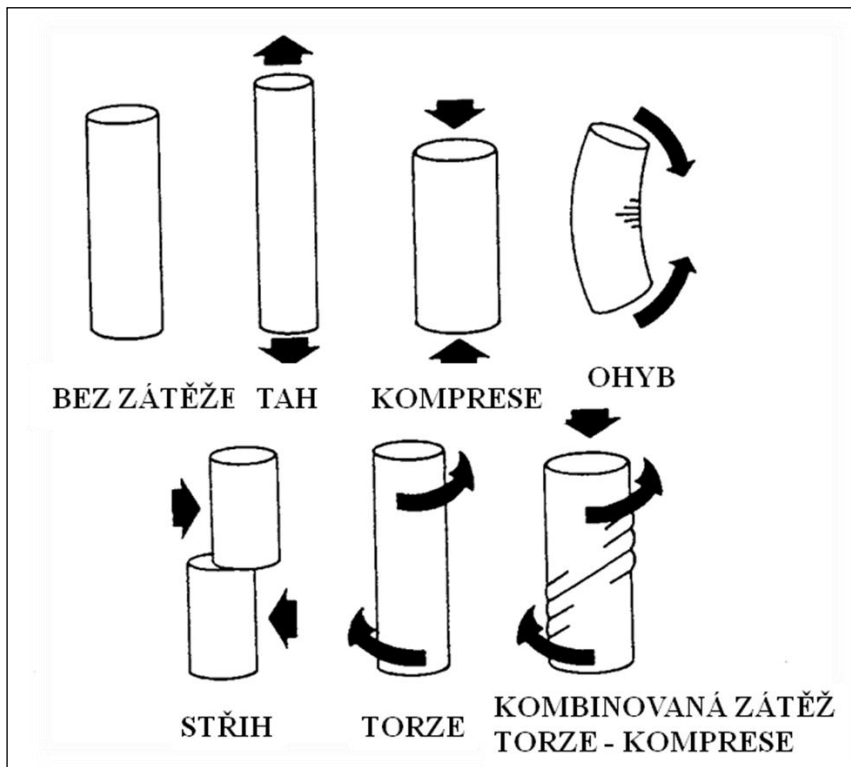
Obr. 2: Struktura lakuno-kanalikulární porozity hutné kostní tkáně u myši.



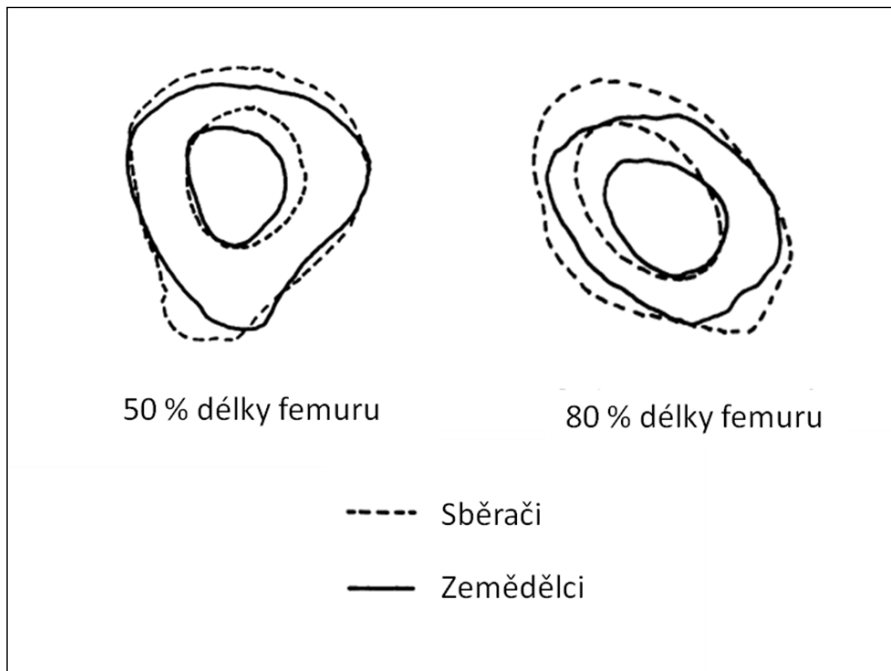
Obr. 3: Napěťově-deformační křivka (upraveno podle Nordin and Frankel, 2001)



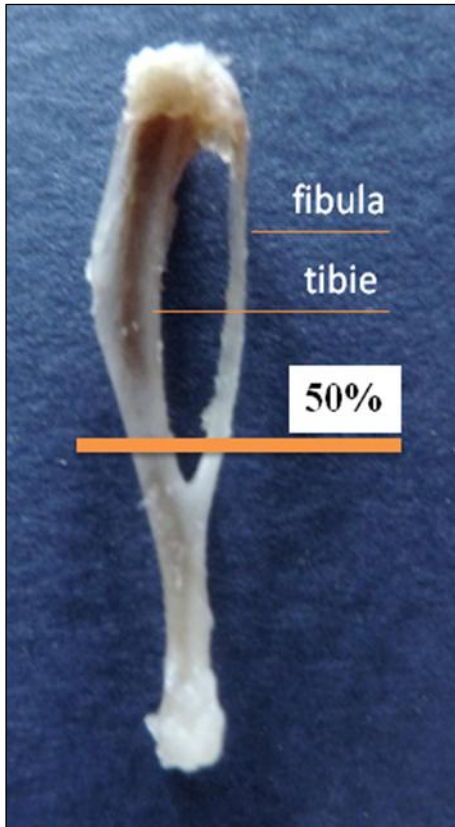
Obr. 4: Model jednoduché zpětné vazby funkční adaptace kosti (upraveno podle Lanyon, 1982; Ruff et al., 2006).



Obr. 5: Typy zátěže působící na kost (upraveno podle Nordin and Frankel, 1980).



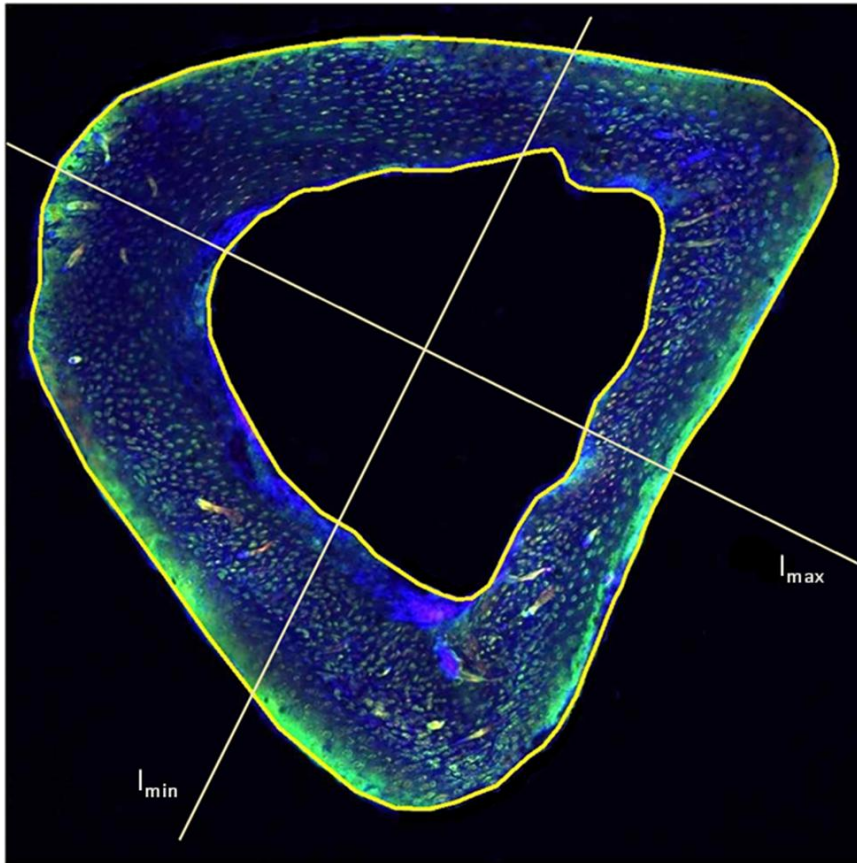
Obr. 6: Změny ve tvaru transverzálního průřezu těla femuru způsobené přechodem k zemědělství na pobřeží Georgie, USA (upraveno podle Ruff et al., 1984).



Obr. 7: Tibie – transverzální průřez byl veden v 50 % biomechanické délky kosti.



Obr. 8: Pila s diamantovým kotoučem IsoMet 1000 (Buehler Ltd.).



Obr. 9: CSG analýza v programu ImageJ (žlutě je označena periostální a endostální hranice, osy udávají oblast I_{max} a I_{min} , které znázorňují oblasti řezu nejvíce a nejméně odolné v ohybu).