

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Ondřej Souček

## Využití periferního kvantitativního CT pro časnou detekci osteoporózy u dětí s chronickým onemocněním

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Zdeněk Šumník, Ph.D.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato disertační práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze, 2.4.2012

MUDr. Ondřej Souček

**Identifikační záznam:**

SOUČEK, Ondřej. *Využití periferního kvantitativního CT pro časnou detekci osteoporózy u dětí s chronickým onemocněním. [The role of peripheral quantitative CT in early diagnostics of osteoporosis in chronically ill children].* Praha, 2012. 74 s., 3 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pediatriká klinika 2. LF UK a FN v Motole. Školitel Šumník, Zdeněk.

## **Poděkování**

Mé poděkování patří především mému školiteli doc. MUDr. Zdeňku Šumníkovi, Ph.D. za jeho kontinuální a konstruktivní podporu ve všech aspektech nutných k úspěšnému dokončení mého postgraduálního studia.

Děkuji též přednostovi Pediatrické kliniky UK 2.LF a FN v Motole, prof. MUDr. Janu Leblovi, CSc. za spolupráci při organizaci a zpracování výsledků studie dívek s Turnerovým syndromem.

Dále děkuji paní Bärbel Tuttlewski za praktické školení v měření pacientů přístrojem pQCT, a také všem pacientům a jejich rodičům, kteří se studií souvisejících s tématem mé disertační práce zúčastnili.

## OBSAH

1. ÚVOD	9
2. PŘEHLED LITERATURY	11
2.1. Definice osteoporózy	11
2.2. Etiologie osteoporózy	12
2.3. Vývoj kostní hmoty v průběhu dětství a adolescence	13
2.3.1. Hypotéza „peak bone mass“	13
2.3.2. Hypotéza mechanostatu a funkční svalově-kostní jednotka	13
2.4. Metody stanovení kostní pevnosti	16
2.4.1. Duální rentgenová absorbometrie (DXA)	16
2.4.2. Volumetrická kostní denzita: kvantitativní CT (QCT), periferní kvantitativní CT (pQCT)	19
2.4.3. Posouzení mikrostruktury kosti: mikro-CT, high resolution-pQCT, mikro-MR	24
2.4.4. Kvantitativní ultrazvuková denzitometrie (QUS)	26
2.5. Vybrané chronické choroby asociované s osteoporózou, které byly zvoleny jako téma disertační práce	28
3. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	30
3.1. Studie 1: Vliv estrogenů na parametry kostní pevnosti u dívek s Turnerovým syndromem	30
3.2. Studie 2: Vliv snížené mechanické zátěže na parametry kostní pevnosti u chlapců s hemofilí	31

4. METODY	32
4.1. Pacienti	32
4.1.1. Studie 1: Turnerův syndrom	32
4.1.2. Studie 2: Hemofilie	34
4.2. Metodika měření	36
4.2.1. Antropometrické parametry	36
4.2.2. Parametry kostní denzity a geometrie – pQCT	36
4.3. Statistika	37
5. VÝSLEDKY	39
5.1. Studie 1: Turnerův syndrom	39
5.2. Studie 2: Hemofilie	45
6. DISKUZE	51
6.1. Studie 1: Turnerův syndrom	51
6.2. Studie 2: Hemofilie	56
7. ZÁVĚRY	60
8. SOUHRN	61
8. SUMMARY	62
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	72
11. PŘÍLOHY	74

## SEZNAM ZKRATEK POUŽITÝCH V TEXTU

aBMD	plošná kostní denzita (areal Bone Mineral Density)
ANOVA	statistická analýza rozptylu
BMAD	"zdánlivá" kostní denzita kalkulovaná z aBMD (Bone Mineral Apparent Density)
BMC	obsah kostního minerálu (Bone Mineral Content)
BMI	index tělesné hmoty (body mass index)
BSI	index kostní pevnosti (Bone Strength Index)
BUA	oslabení ultrazvukových vln (broadband ultrasound attenuation)
CT	počítačová tomografie
DXA	duální rentgenová absorpciometrie (Dual-energy X-ray Absorptiometry)
FNM	Fakultní nemocnice v Motole
GH	růstový hormon
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus lidské imunodeficience
HR-pQCT	pQCT s vysokým obrazovým rozlišením (High Resolution pQCT)
ISCD	Mezinárodní společnost pro klinickou denzitometrii (International Society for Clinical Densitometry)
LRP5	protein číslo 5 vázaný na receptor nízkomolekulárního lipoproteinu
MA	plocha svalů (muscle area)
mikro-CT	počítačová tomografie s vysokým obrazovým rozlišením
mikro-MR	magnetická rezonance se zvýšeným obrazovým rozlišením
NA	není k dispozici (not available)
OR	poměr rizik (Odds Ratio)
PBM	maximální kostní hmota (peak bone mass)

pQCT	periferní kvantitativní počítačová tomografie
QCT	kvantitativní počítačová tomografie
QUI	index ultrazvukové denzitometrie (quantitative ultrasound index)
QUS	kvantitativní ultrazvuková denzitometrie
RTG	rentgen
SD	směrodatná odchylka (Standardized Deviation)
SMD	Standardized Mean Difference
SOS	rychlost ultrazvukové vlny (speed of sound)
SSI	index kostní pevnosti (Strength-Strain Index)
TS	Turnerův syndrom
T-skóre	směrodatná odchylka od průměru pro zdravé jedince ve věku 21-30 let
vBMD	volumetrická kostní denzita (volumetric Bone Mineral Content)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health organization)
Z-skóre	věkově a pohlavně specifická směrodatná odchylka od průměru pro zdravé jedince



## 1. ÚVOD

Kostní tkáň je tvrdá, mineralizovaná forma pojivové tkáně. Představuje 15-20% hmotnosti lidského těla a má v organismu čtyři základní funkce: mechanickou oporu, ochranu měkkých tkání, udržení homeostázy minerálů a hematopoézu. Jedná se o vysoce metabolicky aktivní orgán, který trvale prochází dvěma navzájem spřaženými fázemi – kostní formací, kdy dochází k aktivaci osteoblastů k novotvorbě kostní tkáně a kostní resorpcí, kdy je kost osteoklasty odbourávána.

Společně s klouby a svaly umožňuje skelet pohyb jedince, přičemž všechny tři tkáně se navzájem ovlivňují ve funkci i struktuře. Americký ortoped Harold Frost ve svých pracích z 80. let 20. století jako první poukázal na to, že kosti se v průběhu života jedince svou strukturou a částečně i svým tvarem adaptují na dlouhodobou mechanickou zátěž mediovanou kosterním svalstvem. Předpokládal existenci negativní zpětné vazby mezi pevností kosti a jejím vnitřním napětím, čímž vytvořil dnes stále akceptovanou a svými následníky dále rozvíjenou teorii mechanostatu neboli utažské paradigma kostní fyziologie (Frost 1987). Na dílo Harolda Frosta navázali svými pracemi Eckhard Schönau a Frank Rauch, kteří prokázali asociaci mezi svalovou a kostní hmotou u zdravých chlapců i dívek (Schoenau et al. 2002; Rauch et al. 2004) a pomocí nové metody periferní kvantitativní CT denzitometrie prokázali pozitivní korelaci mezi pevností kosti a svalovou silou (Schoenau et al. 1996). Do klinické osteologie se tak prosadil termín funkční svalově-kostní jednotka (Schoenau 2005). Cílem konceptu funkční svalově-kostní jednotky je rozlišit primární kostní poruchu od poruchy sekundární, tj. primární poruchy svalové funkce (Fricke a Schoenau 2007), praktickým klinickým dopadem je diferencovaná a individualizovaná terapie osteoporózy.

Funkčnost svalově-kostní jednotky předpokládá existenci regulačního mechanismu. Hlavním senzorem kostní deformace na buněčné úrovni je osteocyt, který je schopen rozpoznat změny v toku a tlaku intersticiální kanalikulo-lakunární tekutiny (Weinbaum et al. 1994). Šíření signálu probíhá intercelulárními kontakty (gap junctions) na koncích cytoplazmatických výběžků, jimiž osteocyt

komunikuje se sousedními osteocyty, a především s efektorovými buňkami na povrchu kosti, tj. osteoblasty. Na molekulární úrovni se v patofyziologii mechanorecepce a mechanotransdukce kostí uplatňuje signalizační kaskáda Wnt/ $\beta$ -katenin, která reguluje kostní novotvorbu (Baron a Rawadi 2007). Modulace této signalizační dráhy probíhá prostřednictvím inhibice vazby Wnt na protein číslo 5 vázaný na receptor nízkomolekulárního lipoproteinu (LRP5) nebo prostřednictvím vlastní mutace LRP5 (Baron a Rawadi 2007). Kromě systému Wnt/ $\beta$ -katenin se mechanorecepce účastní též  $\beta$ -1-integriny (Duncan a Turner 1995) a dlouhodobě působící kalciové kanály (Li et al. 2002), vyřazení jejich funkce vede ke snížené expresi NO a prostaglandinu E2, což jsou markery indukující kostní novotvorbu (Forwood 1996; Li et al. 2002; Litzemberger et al. 2010).

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1. Definice osteoporózy

Osteoporóza je definována jako systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem organické i anorganické kostní hmoty s poruchou mikroarchitektury kostní tkáně, a v důsledku toho sníženou kostní pevností a zvýšeným rizikem fraktur (Seeman a Delmas 2006). Dle WHO je osteopenie a osteoporóza u dospělých definována na základě snížení kostní denzity od průměru pro mladé zdravé dospělé jedince stejného pohlaví vyjádřené ve směrodatných odchylkách (tzv. t-skóre < 1, resp. <2,5) (Kanis et al. 1994). Interpretace výsledků vyšetření kostní denzity/obsahu kostního minerálu u dětí představuje specifickou problematiku, a to jak v technické, tak v teoretické rovině. Během dětství a adolescence se spolu s tělesným růstem zásadně mění geometrie a architektura kostí, což se odráží v hodnotě kostní denzity/obsahu kostního minerálu stanovované v osteologické praxi nejčastěji (podobně jako u dospělých) duální rentgenovou absorpciometrií (DXA). Kostní denzitu dítěte bychom v ideálním případě měli porovnávat s kontrolní populací nejen stejného věku a pohlaví, ale též stejné tělesné výšky, fáze pubertálního vývoje a rasy, pro což ale v klinické praxi chybí adekvátní data. Další důležitou premisou specifickou pro pediatrickou osteologii je fakt, že prediktivní hodnota samotné kostní denzity pro riziko fraktur je u dětí podstatně nižší než u dospělých (Clark et al. 2006). Tato východiska byla zohledněna při formulaci nejnovějšího Doporučení Mezinárodní společnosti klinické denzitometrie pro diagnostiku a terapii dětské osteoporózy (ISCD; [www.iscd.org](http://www.iscd.org)) (Rauch et al. 2008), podle kterého se u dětí individuální kostní denzitu nedoporučuje vyjadřovat v t-skóre, ale jako odchylku od průměru pro jedince totožného pohlaví a věku (tzv. z-skóre). Snížená kostní denzita je u dětí definována jako z-skóre  $\leq -2$  při vyšetření metodou DXA. Základním rozdílem proti vnímání osteoporózy u dospělých je dále premisa, že diagnostika osteoporózy u dětí je založena na snížené kostní denzitě a zároveň na pozitivní anamnéze klinicky významných fraktur (obr. 1).

**Snížená kostní denzita**  
(měření pomocí DXA):

aBMD/BMC Z-skóre  $\leq -2$   
(adjustováno na věk, pohlaví a výšku)



**Přítomnost klinicky významných  
fraktur v anamnéze**  
(minimálně jedna z možností):

- a) 1 a více fraktur dlouhých kostí dolních končetin
- b) 2 a více fraktur dlouhých kostí horních končetin
- c) vertebrální kompresivní fraktura

**Obr. 1. Diagnostická kritéria osteoporózy v dětském věku (5-19 let). aBMD=plošná kostní denzita, BMC=obsah kostního minerálu**

## 2.2. Etiologie osteoporózy

Na základě etiopatogeneze se osteoporóza rozděluje na primární a sekundární, tedy způsobenou jiným onemocněním. Primární osteoporóza je relativně vzácná, do této kategorie patří osteogenesis imperfecta (prevalence 6-7/100 000), a též etiologicky ne příliš objasněná a jistě heterogenní primární juvenilní osteoporóza (předpokládaná prevalence 3-4/1 000 000). Sekundární osteoporóza vzniká v důsledku jiného základního onemocnění a/nebo jeho terapie se u dětí vyskytuje podstatně častěji. Nejčastější příčiny osteoporózy u dětí shrnuje tabulka 1.

**Tab. 1. Onemocnění spojená se sníženou kostní denzitou a/nebo frakturami v dětském věku.**

Vrozená geneticky podmíněná onemocnění	Ehlersův-Danlosův syndrom, fibrózní dysplázie, homocystinurie, hypofosfatémie, idiopatická hyperkalciurie, Marfanův syndrom, Menkesův syndrom, osteogenesis imperfecta, cystická fibróza
Získaná chronická onemocnění	mentální anorexie, celiakie, diabetes mellitus I. typu, nespecifické střevní záněty, malignity, stavy po transplantaci, renální selhání, juvenilní idiopatická artritida
Poruchy endokrinních regulací	Cushingův syndrom, deficit růstového hormonu, hyperparathyreóza, hyperthyreóza, deficit či rezistence k pohlavním hormonům
Onemocnění spojená s dlouhodobou imobilizací	Dětská mozková obrna, svalové dystrofie, paraplegie, spina bifida, hypotonie
Idiopatické poruchy	idiopatická juvenilní osteoporóza, idiopatická skolióza

## **2.3. Vývoj kostní hmoty v průběhu dětství a adolescence**

### **2.3.1. Hypotéza „peak bone mass“**

V průběhu růstu a dospívání dochází k výraznému nárůstu kostní hmoty. Nejvyšších hodnot (tzv. PBM – peak bone mass) dosahuje člověk na přelomu 3. a 4. dekády života (Bachrach 2005), poté dochází k pozvolnému úbytku se známou akcelerací u žen po menopauze a částečně i u mužů v andropauze (Szulc et al. 2003; Neer 2010). Podle hypotézy PBM má dosažení maximální kostní hmoty během dětství a adolescence zásadní význam v prevenci osteoporózy v dalších desetiletích. Je-li fyziologický proces nárůstu kostní hmoty v dětství narušen, zvyšuje se riziko vzniku fraktur v pozdějším věku. Pro definitivní potvrzení této myšlenky by však bylo nutné provést rozsáhlou prospektivní studii, která by prokázala, že nízký PBM skutečně predisponuje ke zvýšenému riziku fraktur v dospělosti a stáří a naopak.

### **2.3.2. Hypotéza mechanostatu a funkční svalově-kostní jednotka**

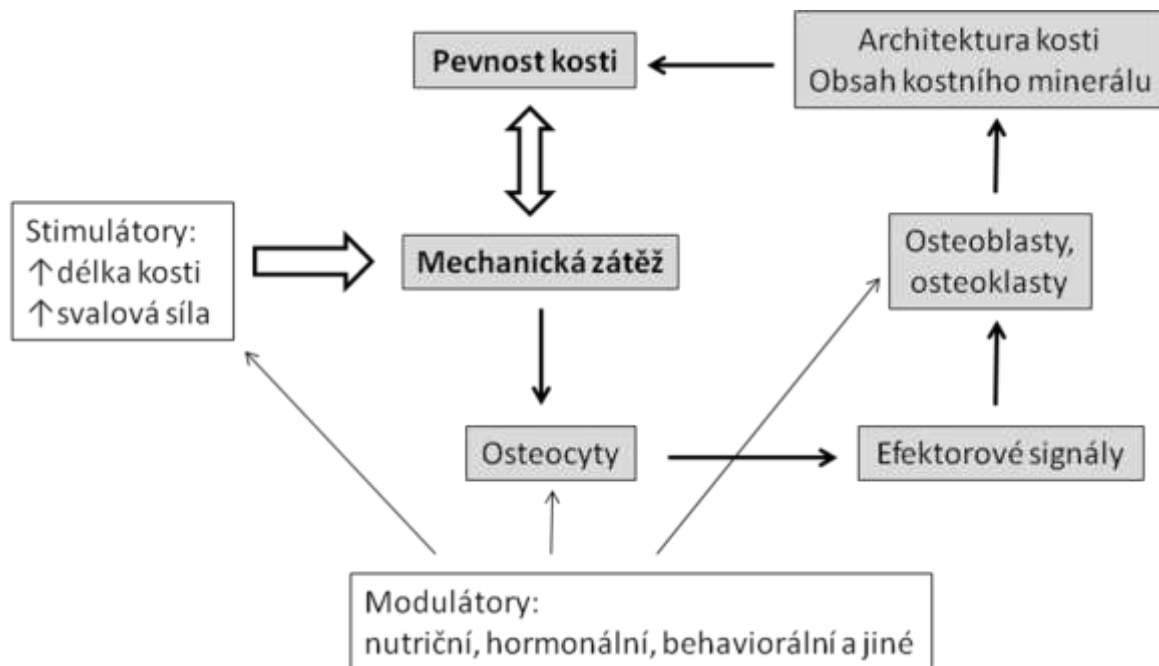
V mírné kontroverzi s konceptem PBM je již v úvodu zmíněná Frostova teorie mechanostatu (Frost 1987). Podle této teorie má na pevnost kosti zásadní vliv mechanická zátěž působená kosterním svalstvem (obr. 2). Při zvýšené mechanické zátěži se pevnost kosti zvyšuje, při imobilizaci naopak pevnost klesá. Z mnoha studií potvrzujících tuto hypotézu lze uvést práci Haapasala *et al.*, která popisuje pozitivní efekt tréninku (resp. svalové zátěže) na nárůst denzity kosti u hráček tenisu, kdy byl stranový rozdíl na horních končetinách u tenistek větší (16 %) ve srovnání s kontrolní skupinou (5 %) (Haapasala et al. 1998). Zajímavým nálezem bylo, že tento rozdíl nebyl u prepubertálních dívek statisticky významný, zvýraznil se až během puberty s maximem po dosažení pohlavní zralosti. Přítomnost pohlavních hormonů tedy zřejmě augmentuje efekt svalové zátěže na nárůst kostní denzity v průběhu pubertálního růstového spurtu. Naopak, kost, která není mechanicky stimulovaná, ztrácí svou denzitu, jak mj. prokazuje japonská studie kostní denzity u sportovců po traumatu míchy

odkázaných na invalidní vozík (Miyahara et al. 2008). V rozporu s hypotézou PBM je také fakt, že byl prokázán významný úbytek kostní denzity vrcholových sportovců po ukončení své kariéry (Gustavsson et al. 2003) a nebyl prokázán rozdíl v denzitě či riziku fraktur ve stáří mezi bývalými vrcholovými sportovci a osobami bez sportovní anamnézy (Karlsson et al. 2000).

Potvrzení teorie mechanostatu zmíněnými studiemi a biomechanický koncept zdůrazňující, že největší deformaci kostí působí činnost kosterního svalstva na podkladě pákového mechanismu (Özkaya a Nordin 1998) byly faktory vedoucí k zavedení pojmu „funkční svalově-kostní jednotka“ do klinické osteologie (Schoenau 2005).

Hlavním buněčným senzorem kostní deformace způsobené činností kosterního svalstva je osteocyt, který reaguje na změny v toku a tlaku intersticiální kanalikulo-lakunární tekutiny (Weinbaum et al. 1994). Signál je v kosti šířen pomocí gap junctions na koncích dlouhých cytoplazmatických výběžků, jimiž osteocyt komunikuje se sousedními osteocyty a také s efektorovými buňkami – osteoblasty - na povrchu kosti. V současné době též existují data přibližující patofyziologii mechanorecepce a mechanotransdukce kostí na molekulární úrovni. Protein číslo 5 vázaný na receptor pro nízkomolekulární lipoprotein (LRP5) je složkou receptorového komplexu, který je aktivován molekulou Wnt. Následkem aktivace tohoto receptorového komplexu je zvýšení intracelulární koncentrace  $\beta$ -kateninu. Při překročení své prahové koncentrace přestupuje  $\beta$ -katenin do jádra a stává se jaderným transkripčním regulátorem několika genů ovlivňujících diferenciaci a funkci osteoblastů (např. Runx2, Sox9 směřují diferenciaci mezenchymální kmenové buňky v osteoblast a blokují diferenciaci v chondrocyt (Hill et al. 2005)). Inaktivační mutace LRP5 jsou spojené s nízkou kostní denzitou (Gong et al. 2001), naopak aktivační mutace LRP5 byla asociována s vyšší kostní denzitou a pevností kosti u lidí i u transgenních myší (Boyden et al. 2002; Little et al. 2002). Na mechanorepceci se též podílejí napětově řízené kalciové kanály s dlouhým účinkem (Walker et al. 2000), jejichž aktivace mechanickým stimulem vede k intracelulárnímu influxu  $\text{Ca}^{2+}$  s následným uvolněním NO a prostaglandinů, které indukují kostní novotvorbu (Forwood 1996; Li et al. 2002).

Neméně důležitým prostředkem mechanorecepce osteocytů jsou integriny. Inhibice transmembránové signalizace mechanického stimulu přes integrin  $\beta(1)$  oddělením jeho extracelulární receptorové části vede k inhibici exprese cyklooxygenázy a sekrece prostaglandinu E2, který je markerem kostní novotvorby (Litzenberger et al. 2010).



**Obr. 2. Vývoj kosti z pohledu teorie mechanostatu. Klíčovým faktorem ve vývoji kosti je silná korelace mezi mechanickou zátěží kladenou na kost a její pevností, která je dána kvalitou kostní tkáně, její architekturou a geometrickými rozměry. Zobrazeny jsou též modulující faktory, které do tohoto systému významně zasahují. Upraveno podle (Rauch 2006).**

## 2.4. Metody stanovení kostní pevnosti

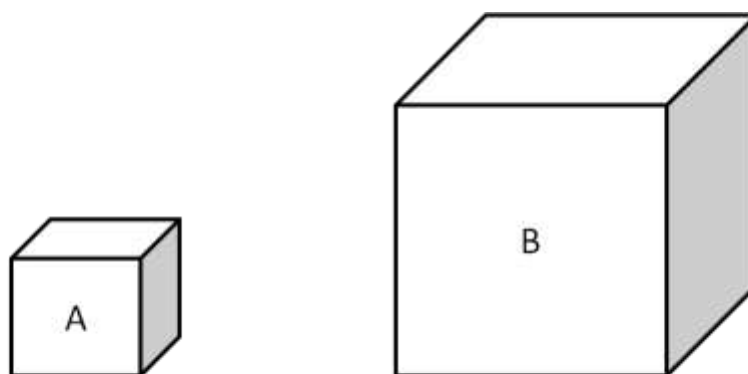
### 2.4.1. Duální rentgenová absorpciometrie (DXA)

Nejpoužívanější metodou umožňující měření kostní denzity je duální rentgenová absorpciometrie (**DXA** - dual energy X-ray absorptiometry). Princip vyšetření je založen na faktu, že zeslabení intenzity záření, kterému byla tkáň exponována, je přímo úměrné denzitě této tkáně. Díky použití dvou odlišných energetických hladin záření je možné pomocí matematických metod subtrahovat měkké tkáně. To umožňuje měření kostní denzity lumbální páteře nebo proximálního femuru bez sumace s okolními tkáněmi. Kromě měření lokální kostní denzity lze pomocí DXA analyzovat celotělovou kostní denzitu, fat mass (podkožní a viscerální tuk) a lean body mass tvořený zejména svalovou hmotou.

Základní veličinou stanovovanou pomocí DXA je **BMC** (bone mineral content, **obsah minerálů v kosti**), který je přímo úměrný oslabení rentgenového paprsku při průniku kostí. Pokud se tento parametr změřený v dané oblasti skeletu vydělí plochou, na kterou se skelet či jeho část promítne, získáme tzv. **plošnou kostní denzitu (aBMD – areal bone mineral density; aBMD=BMC/plocha kosti)**, vyjadřovanou v  $\text{g}/\text{cm}^2$ . Na základě tohoto parametru se v současné době definuje osteoporóza u dospělých (dle WHO, (Kanis et al. 1994)), a je též jedním z diagnostických kritérií osteoporózy u dětí (dle ISCD, (Rauch et al. 2008)). Areální BMD má však pro analýzu pediatrických pacientů zásadní nevýhodu, protože takto vypočtená denzita ignoruje třetí rozměr kosti. Nález snížené aBMD proto může mít několik příčin. Může se jednat (A) o osteopenii, resp. osteoporózu (méně kostní tkáně), (B) o demineralizaci (osteomalacii, méně minerálu v kostní tkáni), (C) nebo má kost menší rozměry při stejné fyzikální denzitě. U menšího dítěte bude aBMD ve srovnání se stejně starým větším dítětem falešně snížena (obr. 3). U dětí s poruchou růstu (a též u dospělých s menším věkem) tak může snadno dojít k podhodnocení kostní denzity a falešné diagnostice osteoporózy. Důkazem je práce



srovnávající plošnou denzitu - aBMD (měřenou DXA) a volumetrickou denzitu - vBMD (měřenou kvantitativním CT – viz dále v textu), které se zúčastnilo 400 dětí (Wren et al. 2005). Cílem studie bylo zjistit korelaci z-skóre denzity lumbálních obratlů. Lineární korelace mezi oběma metodami byla 0,39 (po korekci aBMD na antropologické parametry se korelační koeficient zvýšil na 0,55). Pozitivní prediktivní hodnota (DXA pro kvantitativní CT) byla však nízká (28%). Zatímco 58/400 dětí vyšetřených DXA mělo z-skóre  $\leq -2$ , pouze 7/400 jich mělo z-skóre pod touto hranicí měřeno metodou kvantitativní CT. Podrobná antropometrická analýza odhalila, že z těchto 58 dětí mělo 30 podprůměrnou výšku a 22 mělo nízkou hmotnost vzhledem k věku.



Krychle	Délka základny (cm)	Plocha (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	aBMD (g/cm <sup>2</sup> )	vBMD (g/cm <sup>3</sup> )
A	1	1	1	1	1
B	2	4	8	2	1

**Obr. 3. Rozdíl mezi plošnou a volumetrickou kostní denzitou. Dvě krychle vyrobené ze stejného materiálu jsou změřené různými denzitometrickými technikami. Větší krychle bude mít větší plošnou denzitu (měřenou DXA), přestože volumetrická denzita (měřená QCT) je stejná. Upraveno podle (van Rijn a van Kuijk 2002). BMC = obsah kostního minerálu; aBMD = plošná kostní denzita; vBMD = volumetrická kostní denzita.**

Existují způsoby, jak zmíněný metodologický nedostatek DXA eliminovat. Prvním z nich je kalkulace objemu obratlového těla pomocí stanovení výšky či šířky obratle, výsledkem je výpočet tzv.

**„zdánlivé“ kostní denzity (BMAD – bone mineral apparent density)**. Tyto algoritmy jsou však simplifikující, předpokládají totiž, že tělo obratle má tvar válce (Kroger et al. 1992), resp. koule (Carter et al. 1992). Jiný přístup vztahuje naměřený obsah kostního minerálu k projikované ploše kosti, tělesné výšce, hmotnosti a hodnocení pubertálního vývoje dle Tannera (Prentice et al. 1994). Relativně racionálním přístupem (Molgaard et al. 1997) je třístupňový algoritmus posuzující nejprve tělesnou výšku k věku, dále projikovanou plochu kosti k tělesné výšce a poté BMC k projikované ploše. Tak lze do určité míry odlišit falešně nízkou aBMD z důvodu malých kostí od skutečně snížené kostní denzity. Limitací všech zmíněných přístupů je však jejich relativní složitost použití, resp. chybějící referenční pediatrická data. Dalším problémem v hodnocení denzitometrických výsledků metodou DXA je významná rozdílnost výsledků při použití přístrojů různých výrobců či odlišných softwarových verzí (Leonard et al. 1999).

Pro posouzení významu jednotlivých denzitometrických metod pro klinickou praxi je zásadní stanovit vztah mezi změřenou hodnotou kostní denzity a rizikem fraktur. Z tohoto úhlu pohledu nejsou výsledky studií v případě metody DXA příliš povzbudivé. Clark *et al.* provedl rozsáhlou prospektivní denzitometrickou studii 6213 dětí, která prokázala signifikantní, ale poměrně slabou korelaci mezi sníženou kostní denzitou a výskytem fraktur (OR 1,12) (Clark et al. 2006). Nejlepším prediktorem fraktur byla hodnota celotělového BMC korigovaná na výšku, váhu a projikovanou plochu skeletu, kdy snížení o 1 SD vedlo ke zvýšení rizika fraktur o 89% ve 2 sledovaných letech. Relativně lepší výsledky byly dosaženy v méně rozsáhlé průřezové retrospektivní studii zaměřené pouze na děti po úraze, kdy pacienti s frakturou předloktí měly nižší aBMD na předloktí i na páteři (cca o 3%) než děti po úraze předloktí ale bez fraktur (OR 1,35 a 1,42) (Kalkwarf et al. 2011).

Pozitivní prediktivní hodnota t-skóre vzhledem k riziku fraktur u dospělých je o něco vyšší než u dětí, nicméně stále nedosahuje dostatečné rozlišovací přesnosti pro klinickou diagnostiku. V roce 2005 byla publikována metaanalýza hodnotící vztah mezi denzitou a rizikem fraktur u dospělých (Johnell et al. 2005). Nejlepším prediktorem osteoporotických fraktur byla denzita v oblasti krčku femuru. Při snížení denzity o 1 SD bylo u mužů riziko zlomeniny krčku femuru 2,94 násobné, u žen 2,88 násobné. Riziko bylo však věkově specifické. U mladších pacientů byla výpovědní hodnota snížené denzity mnohem vyšší než u starších, přestože absolutně se riziko fraktur s rostoucím věkem zvyšuje. Z pozorování vyplývá, že ve vyšším věku se uplatňují další rizikové faktory. Francouzská studie OFELY (Albrand et al. 2003) zmiňuje například samotný věk nad 65 let (OR 1,9), předchozí pády (OR 1,76) nebo nízkou fyzickou aktivitu (OR 2,08). Podobně kanadská studie popisuje významnou korelaci mezi sníženou denzitou a zvýšeným rizikem fraktur, konstatuje však, že až 60% všech osteoporotických zlomenin se vyskytuje u žen klasifikovaných pomocí DXA jako normální či osteopenické a zdůrazňuje nezbytnost využití dalších klinických faktorů v hodnocení individuálního rizika fraktur (Cranney et al. 2007).

#### **2.4.2. Volumetrická kostní denzita: kvantitativní CT, periferní kvantitativní CT**

Volumetrické metody využívají ke stanovení denzity kostní tkáně počítačovou tomografii (CT). Tato metoda porovnává oslabení záření v každém jednotlivém voxelu (krychle či kvádr daných rozměrů, základní jednotka pro obrazové zpracování dat) v transverzálním průřezu kostí s oslabením záření, které prošlo fantomem hydroxyapatitu o známé denzitě. Každému voxelu je pak přiřazena hodnota odpovídající lokální denzitě tkáně, pro finální výpočet **vBMD (volumetrická denzita, volume bone mineral density, jednotka g/cm<sup>3</sup>)** jsou zahrnuty všechny voxely ve vyznačené oblasti. Z principu metody vyplývá, že volumetrická kostní denzita není ovlivněna velikostí kosti.

Další výhodou této metody je schopnost odlišit denzitu trabekulární a kortikální kosti, což významným způsobem zpřesňuje odhad skutečné rezistence kosti vůči tlaku, tahu a torzi. **Kortikální kost** tvoří přibližně 85% skeletu, 90% objemu je mineralizováno a její hlavní funkcí je pevnost kosti. Stanovení denzity kortikální kosti je důležité při posuzování její kvality, jak bylo prokázáno v průřezové studii 52 hemodialyzovaných pacientů, kdy snížená kortikální denzita predikovala velmi dobře vznik fraktur (OR=16,67), zatímco aBMD lumbální páteře ani krčku femuru měřená pomocí DXA pacienty s frakturami a bez fraktur nerozlišila (OR=0,53, resp. 0,69) (Jamal et al. 2006).

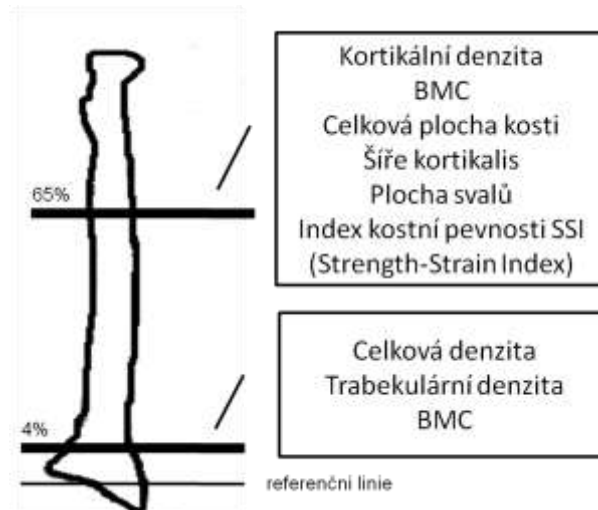
**Trabekulární kost** tvoří zbylých 15 objemových procent skeletu, mineralizováno je pouze přibližně 25% jejího objemu. Vzhledem k několikanásobně většímu povrchu je tento kompartment kosti metabolicky mnohem aktivnější, a tedy vulnerabilnější. Nález snížené denzity trabekulární kosti umožní časně odhalení frustních změn kostního metabolismu, například v důsledku chronického zánětu, či posouzení efektu terapie v longitudinální studii. Vliv trabekulárního kompartmentu na celkovou pevnost kosti je zmíněn dále v textu (viz 2.4.4. Metody umožňující posouzení mikrostruktury kosti).

### **Kvantitativní CT (QCT)**

Touto metodou lze měřit denzitu kterékoliv části skeletu, v klinických studiích se nejčastěji používá k měření volumetrické denzity lumbálních obratlů či denzity krčku femuru. Klinické využití QCT v dětském věku je však vzhledem k relativně vysoké radiační zátěži diskutabilní (tab. 2). S tím souvisí i nedostupnost populačních studií a potřebných referenčních hodnot. Tato metoda se proto do běžné klinické praxe zatím neprosadila.

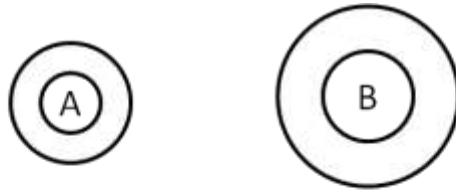
## Periferní kvantitativní CT (pQCT)

Tato metoda si zachovává výhody QCT, je ale levnější, mobilní a je spojena s mnohem menší radiační zátěží (tab. 2). Je určena k měření kostní denzity dlouhých kostí končetin, tedy nejčastěji radia a tibie, lze však vyšetřit i humerus či femur. Prvním krokem během tohoto vyšetření je vyznačení referenční linie, která se na počátečním plánovacím snímku umístí do oblasti distální růstové chrupavky (nebo kloubní chrupavky, je-li růstová již uzavřena). Ve vzdálenosti 4%, resp. 65% délky předloktí měřené od referenční linie proximálním směrem se provede vždy jeden CT snímek. Na snímku v 4% vzdálenosti se hodnotí obsah kostního minerálu, trabekulární denzita a celková plocha kosti na průřezu, v 65% vzdálenosti se hodnotí obsah kostního minerálu, kortikální denzita, šíře kortikalis, plocha kortikální kosti a index kostní pevnosti SSI. Pro tyto veličiny (obr. 4) jsou dostupná pediatrická referenční data (Rauch a Schoenau 2005; Rauch a Schoenau 2008).



**Obr. 4. Standardní měření parametrů kostní denzity a geometrie na předloktí pomocí pQCT. Na plánovacím snímku periartikulární části distálního konce předloktí se vymeží referenční linie. Od ní se provede CT snímek ve 4% a 65% vzdálenosti celkové délky předloktí. Upraveno podle (Neu et al. 2001).**

Kromě již uvedených výhod lze dále pomocí pQCT posoudit geometrické parametry kosti, které mají těsný vztah s její pevností. V klinické praxi nejčastěji využíváme celkovou plochu kosti v transverzální rovině, relativní plochu kortikální kosti, šíři kortikalis nebo obvod periostu i endostu. Na základě poznatků materiálové fyziky lze tyto parametry použít k výpočtu **indexů kostní pevnosti (BSI - bone strength indices)**, které velmi dobře korelují s experimentálně ověřenou rezistencí. Prvním z nich je index popisující rozložení materiálu kolem osy předmětu (**polar moment of inertia**, polární moment setrvačnosti). Se zvyšujícím se momentem setrvačnosti stoupá odolnost materiálu (kosti) v torzi (materiál je distribuován dále od středu). Dalším je modul odporu průřezu (**section modulus**), který na podobném principu popisuje pevnost materiálu v ohybu. Oba parametry jsou přímo závislé na ploše kosti v transverzálním průřezu (obr. 5). Studie ex vivo na zvířecích kostech prokázala významnou korelaci indexu kostní pevnosti měřeného pQCT (kortikální denzita x plocha kortikální kosti) s pevností diafýzy humeru i femuru ( $r=0,58$ ;  $r=0,70$ ) (Siu et al. 2003). Klinické využití indexů kostní pevnosti dokumentuje studie provedená na kadaverózních lidských vřetených kostech, která porovnávala vliv jednotlivých parametrů měřených DXA a pQCT na predikci prahu pevnosti měřeného ex vivo testem simulujícím pád na předloktí (Muller et al. 2003). Výsledky ukázaly velmi dobrou korelaci mezi **SSI** (strength strain index, produkt kortikální vBMD a modulu odporu průřezu), a prahem pevnosti ( $r^2=0,85$ ). Dalším významným prediktorem pevnosti byla plocha kortikalis vřetení kosti ( $r^2=0,75$ ). Kombinací denzity kosti (měřené DXA i pQCT) a plochy kortikalis měřené pQCT došlo k významnému zvýšení korelace s pevností ve srovnání se samotnou kostní denzitou ( $r^2=0,6$  vs.  $0,86$  pro aBMD vs. aBMD+kortikální plocha;  $r^2=0,47$  vs.  $0,86$  pro vBMD vs. vBMD+kortikální plocha)(Muller et al. 2003). Používání indexů kostní pevnosti je významné pro klinickou práci, protože jejich zahrnutí do diagnostického plánu významně zpřesňuje predikci fraktur v porovnání s využitím izolované kostní denzity.



Transverzální průřez kostí	A	B
Průměr (%)	100	150
Volumetrická denzita (%)	100	100
Obsah kostního minerálu (%)	100	225
Modul odporu průřezu (%)	100	338

**Obr. 5. Vliv geometrie kosti na její pevnost. Kružnice A a B představují transverzální průřez dlouhou kostí. Vnější průměr kosti B je o 50% větší než kosti A. Při stejné volumetrické denzitě bude mít kost vpravo větší modul odporu průřezu, tedy větší pevnost v ohybu a torzi a nižší riziko fraktur. Upraveno podle (Schoenau et al. 2002).**

Vedle volumetrické denzity a geometrických parametrů kosti lze pomocí pQCT stanovit na 65% místě délky předloktí i plochu svalů, čehož se využívá v hodnocení etiologie snížené kostní pevnosti. Dle hypotézy mechanostatu (viz kapitola 2.3.2.) je pevnost kostí významně determinována mechanickou zátěží. Největší mechanická zátěž kosti je vyvolávána kontrakcí kosterního svalstva. Plocha svalů měřená pQCT je nepřímým, ale velmi dobrým ukazatelem svalové síly a prediktorem pevnosti kostí (Macdonald et al. 2006; Binkley a Specker 2008). V citovaných studiích byla prokázána významná korelace plochy kortikální kosti, celkové plochy kosti a indexu kostní pevnosti SSI s plochou svalů u obou pohlaví. Korelace celkové a kortikální denzity s plochou svalů však byla nízká. Z toho lze dovodit, že se kosti na zvýšené mechanické nároky adaptují nikoliv zvýšením své denzity, ale periostální apozicí.

## Limitace QCT a pQCT

Určitou limitací volumetrických metod je tzv. **efekt hraničních voxelů** (partial volume effect). Voxely (krychle či kvádry daných rozměrů, základní jednotka pro obrazové zpracování dat) nacházející se na okraji kosti (na hranici s periostem a endostem) jsou částečně vyplněné kostí a částečně měkkými tkáněmi obklopujícími kost. V závislosti na poměru těchto dvou tkání má pak hraniční voxel densitu odpovídající hodnotě mezi densitou kosti a densitou měkkých tkání, což může zkreslit výsledky vyšetření, protože s větším podílem hraničních voxelů klesá průměrná hodnota všech voxelů představujících kortikální kost. Tento efekt se uplatňuje u kostí s kortikální tenčí než 2 mm (Binkley a Specker 2000). Byly navrženy matematické formule pro minimalizaci tohoto efektu (Rittweger et al. 2004). Efekt lze eliminovat také vyšším rozlišením (zmenšením rozměrů voxelu), což však vyžaduje vyšší radiační dávku. S vědomím této technické limitace je standardem měřit kortikální densitu na 65% místě radia, kde je kortikalis nejširší.

### 2.4.3. Posouzení mikrostruktury kosti: mikro-CT, high resolution-pQCT, mikro-MRI

Tyto metody slouží primárně k detailnímu posouzení mikroskopické architektury kostní tkáně a do značné míry nahrazují bioptickou kostní histomorfometrii.

**Mikro-CT** dokáže při svém rozlišení 8  $\mu\text{m}$  dobře zobrazit mikroarchitekturu kosti, včetně tloušťky, počtu a struktury trabekul. Vzhledem k vysoké radiační zátěži a časově náročnému vyšetření (v řádu hodin) je však doposud mikro-CT experimentální metodou používanou pro měření ex vivo.

**High resolution-pQCT** je jediná metoda s vysokým rozlišením využívaná k měření mikroarchitektury kostí apendikulárního skeletu in vivo. Výstupem měření jsou objem mineralizované kosti v celkovém



objemu kostní tkáně a charakteristika trámčů (počet, tloušťka, vzájemný odstup). Tyto parametry dobře korelují s klasickou bioptickou histomorfometrií a jejich koeficient variability při opakovaném měření je velmi nízký (<0,5%) (Muller et al. 1996). Strukturální parametry trabekulární kosti v porovnání s densitou měřenou DXA lépe diferencují pacienty se zvýšeným rizikem kostních fraktur (Boutroy et al. 2005). Pomocí HR-pQCT na radiu bylo zjištěno, že úbytek mineralizované kostní tkáně v seniu se mezi pohlavími příliš neliší. Zatímco u mužů byl tento úbytek způsoben ztenčováním kostních trámčů, u žen došlo k úbytku celkového počtu trámčů a ke zvýšení jejich vzájemné vzdálenosti. Ztenčování trámčů má na snížení pevnosti kosti menší vliv než jejich celkový úbytek. Lze tak vysvětlit větší sklon k frakturám u žen ve vyšších deceniích (Khosla et al. 2006). Na tomto rozdílu mezi pohlavími se pravděpodobně podílejí pohlavní hormony. Estrogeny blokují během pubertálního vývoje endostální resorpci (Schoenau et al. 2000), což vede k menšímu endosteálnímu obvodu a větší kortikální ploše dlouhých kostí bez vlivu na pevnost kosti u mladých dospělých žen v porovnání s muži (Schoenau et al. 2001). Perimenopauzální úbytek estrogenů pak vede k odbržděné resorpci trabekul (Macdonald et al. 2011). Testosteron naopak zvyšuje svalovou hmotu (a sílu), na což se kost v souladu s teorií mechanostatu adaptuje zvětšením svých rozměrů (zvýšením pevnosti), sekundárně však také dochází ke ztluštění trabekul, což snižuje riziko fraktur u mužů ve srovnání se ženami (Seeman 2002).

**Mikro-MR** využívá principu magnetické rezonance a dokáže podobně jako předchozí dvě metody stanovit strukturální parametry trabekulární kosti. Studie u dospělých prokazují, že strukturální parametry získané touto metodou lépe korelují s výskytem fraktur než samotná kostní densita (Wehrli et al. 2001). Studie u dětí jsou zatím ojedinělé, prokazují však významné změny u pacientů s mozkovou obrnou oproti kontrolám (Modlesky et al. 2008). Tyto práce jsou pilotními studiemi a kromě nižší dostupnosti samotné MR není poměrně sofistikovaný vyhodnocovací software zatím komerčně dostupný.

**Tab. 2. Porovnání radiační zátěže jednotlivých denzitometrických metod a vybraných běžných radiodiagnostických vyšetření. Hodnoty efektivních dávek uváděných jednotlivými autory se velmi liší, jsou značně závislé na typu přístroje, na technických parametrech, na délce skenování i na tělesné konstituci jedince a jeho věku. Pro dětský věk jsou hodnoty odlišné od dospělých, a to i u běžných vyšetření. Čerpáno z [www.crcpd.org](http://www.crcpd.org), (Braun et al. 1998; Genant a Jiang 2006).**

Zobrazovací technika	Efektivní dávka ( $\mu\text{Sv}$ )	Obrazové rozlišení ( $\mu\text{m}$ )
RTG hrudníku	5-43	/
RTG břicha	90-245	/
DXA (Lunar DPX-L; celotělový sken)	0,02-0,03	/
CT břicha	3000-6000	1000-2000
QCT	200-370	100-1000
pQCT	0,22	100-1000
mikro-CT	nepublikováno	10-100
HR-pQCT	3	10-100
mikro-MR	0	100-1000
QUS	0	/
přirozená radiace z prostředí	2500-5000/rok	/

#### **2.4.4. Kvantitativní ultrazvuková denzitometrie (QUS)**

Kvantitativní ultrazvuková denzitometrie (QUS) využívá principu šíření, absorpce a odrazu ultrazvukového vlnění. QUS se provádí především na patní kosti, méně často na patele, tibii, radiu a falanzích. Výstupem měření je rychlost šíření ultrazvukového vlnění kostí (SOS - speed of sound) nebo míra jeho oslabení (BUA - broadband ultrasound attenuation). Některé přístroje umí z těchto dvou hodnot kalkulovat tzv. kvantitativní ultrazvukový index (QUI - quantitative ultrasound index). U dospělých byla prokázána nízká prediktivní hodnota ultrazvukových parametrů pro riziko fraktur (Marin et al. 2006) a korelace se standardními metodami (DXA, pQCT) také není přesvědčivá (Nayak et al. 2006). U dětí prokazují studie diskrepantní nálezy při měření na různých místech a významné

ovlivnění BUA a SOS antropometrickými parametry ve srovnání se samotnou kostní densitou (Fricke et al. 2005). Byl také popsán významný vliv šířky patní kosti a manuálního nastavení oblasti zájmu na ultrazvukové parametry u 500 zdravých dětí (van den Bergh et al. 2000). Podobně Bayer a Kutílek popisují průměrný stranový rozdíl v BUA na patní kosti 11% a spekulují o rozdílné intenzitě mechanického zatížení patní kosti, která by mohla ovlivnit rozměry či mikroarchitekturu v měřené oblasti (Bayer a Kutílek 1997). Přes nesporné výhody této metody není QUS pro nedostatečnou korelaci se standardními metodami a pro svůj nejasně definovaný vztah k pevnosti kostí široce používána a není ani pro účely diagnostické mezinárodními společnostmi doporučována (Krieg et al. 2008).

## 2.5. Vybrané chronické choroby asociované s osteoporózou, které byly zvoleny jako téma disertační práce

### Turnerův syndrom

Turnerův syndrom (TS) je vrozené onemocnění způsobené ztrátou části či celého X chromozomu. Incidence TS je 1:4000 živě narozených dívek a je charakterizován především malým vzrůstem a hypergonadotropním hypogonadizmem způsobeným agenezí či dysgenezí ovarií. Mezi fenotypické charakteristiky dále patří vrozené vady srdce a ledvin, gotické patro, pterygium colli, široce postavené bradavky, lymfedémy a osteoporóza.

Ženy s Turnerovým syndromem mají o 25% vyšší riziko fraktur než ženy zdravé, nejvyšší relativní riziko bylo popsáno na předloktí (RR 1,9; 95% CI 1,1-3,1) (Gravholt et al. 2003). Riziko fraktur stoupá s věkem, významně ohrožené jsou pacientky starší 45 let (OR 19,3; 96% CI 4,1-88,6) (Landin-Wilhelmsen et al. 1999), zvýšené riziko fraktur však bylo popsáno i u prepubertálních dívek (Ross et al. 1991).

U žen s TS byla pomocí DXA nalezena snížená plošná kostní denzita (aBMD) bederní páteře, průměrné z-skóre se pohybovalo mezi -2,3 a -0,8 (Gravholt et al. 2002; Bakalov et al. 2003; Lage et al. 2005). Tyto výsledky však mohou být do značné míry ovlivněny malým vzrůstem patientek, protože aBMD měřená DXA je závislá na tělesné výšce. Po adjustaci na výšku byly hodnoty BMD ve třech uvedených studiích skutečně významně lepší, došlo k nárůstu z-skóre o 0,3 – 1,8 (Gravholt et al. 2002; Bakalov et al. 2003; Lage et al. 2005) a významně se snížilo procento žen splňujících kritéria osteoporózy. Denzitometrické metody stanovující volumetrickou kostní denzitu nejsou na výšce závislé, proto jsou vhodnější k vyšetřování pacientů menšího vzrůstu. Doposud byly publikovány pouze tři studie zabývající se volumetrickou denzitometrií u TS. Pomocí QCT bylo zjištěno, že u dívek s TS se během puberty volumetrická BMD bederních obratlů snižuje, zatímco u zdravých kontrol zůstává beze změny (Nanao et al. 2002). Ve dvou dalších studiích byla u dívek s TS pomocí pQCT

popsána normální trabekulární denzita, nízká kortikální denzita a tenká kortikalis na radiu (Bechtold et al. 2001; Holroyd et al. 2010). Zmíněné denzitometrické studie zahrnovaly relativně málo pacientů v jednotlivých věkových kategoriích. Etiologie kostní fragility u TS nebyla doposud zcela objasněna. V literatuře se spekuluje o vlivu deficitu estrogenů při hypogonadizmu anebo o primární kostní poruše v důsledku gonozomální haploinsuficience.

### Hemofilie

Hemofilie je onemocnění způsobené nedostatkem srážlivého faktoru VII a IX (hemofilie A, resp. B). Incidence je 1:7000 živě narozených chlapců a onemocnění je charakterizováno snadnou tvorbou hematomů a krvácením do svalů a kloubů. Podle hladiny srážlivého faktoru v séru je klasifikována tíže onemocnění (těžká hemofilie <1%, středně těžká 1-5% a mírná 5-40%). U pacientů s těžkou hemofilií se může v důsledku opakovaných krvácení do kloubů vyvinout hemofilická artropatie, která vede ke snížené mobilitě. Snížená mobilita je spojena s úbytkem svalové tkáně, což vede k úbytku kostní hmoty a osteoporóze. Vzhledem k riziku krvácení do kloubů a svalů jsou pacienti s hemofilií mimo jiné limitováni ve fyzické aktivitě a sportu, což také představuje rizikový faktor pro vznik osteoporózy.

Publikované studie ukazují, že pacienti s hemofilií mají v porovnání se zdravou populací nízkou plošnou BMD páteře i krčku femuru (Gallacher et al. 1994; Barnes et al. 2004; Nair et al. 2007). Patogeneze nízké kostní denzity u hemofilie není zcela objasněna: některé studie zmiňují sníženou fyzickou aktivitu, resp. sníženou svalovou sílu (Falk et al. 2005; Tlacuilo-Parra et al. 2008) či získanou infekci hepatitidu C nebo HIV (Gerstner et al. 2009; Katsarou et al. 2010). Recentní meta-analýza prokázala asociaci mezi nízkou aBMD a těžkou hemofilií, asociace s infekcí HCV potvrzena nebyla (Iorio et al. 2010). Vztah mezi sníženou svalovou silou (vyvolanou sníženou mobilitou, resp. omezováním fyzické aktivity) a volumetrickými parametry kostní pevnosti nebyl doposud u těchto pacientů zkoumán.

### **3. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE**

#### **3.1. Studie 1: Vliv estrogenů na parametry kostní pevnosti u dívek s Turnerovým syndromem**

Žádná studie se zatím nevěnovala popisu efektu substituce estrogeny na volumetrickou kostní denzitu a geometrické parametry kosti.

#### **Hypotéza:**

**Mechanismem vzniku zvýšeného rizika fraktur u dívek s TS je deficit kortikální kosti způsobený nedostatečným útlumem resorpce endokortikální kosti v důsledku hypogonadizmu.**

#### **Cíle:**

- 1) Pomocí pQCT stanovit denzitu kostního minerálu trabekulární a kortikální kosti a geometrické parametry proximálního radia u dívek s TS a posoudit rozdíly v závislosti na fázi pubertálního vývoje.**
- 2) Posoudit vliv doby trvání substituce estrogeny na parametry kostní pevnosti.**
- 3) Porovnat parametry kostní pevnosti mezi dívkami s pozitivní anamnézou fraktur a dívkami bez fraktur.**

### **3.2. Studie 2: Vliv snížené mechanické zátěže na parametry kostní pevnosti u chlapců s hemofilii**

Není zatím známo, zda je u chlapců s hemofilii přítomna sarkopenie jako rizikový faktor nízké kostní denzity. Doposud nebyla publikována žádná studie primárně zaměřená na posouzení volumetrické kostní denzity a geometrie u pacientů s hemofilii.

#### **Hypotéza:**

**Mechanismem snížené denzity kostního minerálu je suboptimální mechanická zátěž kostí daná limitovanou fyzickou aktivitou, která se projeví nízkou plochou svalů (sarkopenií). Změny kostní denzity budou korelovat s klinickými a laboratorními parametry tíže onemocnění, resp. muskuloskeletálního postižení.**

#### **Cíle:**

- 1) Pomocí pQCT změřit svalovou plochu, denzitu kostního minerálu a geometrické parametry na předloktí u chlapců s hemofilii a porovnat s referenčními daty.**
- 2) Zhodnotit asociaci mezi svalovou plochou, kostní denzitou a geometrickými parametry radia a závažností hemofilie vyjádřenou sérovou hladinou koagulačních faktorů VIII, resp. IX a počtem krvácení do kloubů a svalů.**

## 4. METODY

### 4.1. Pacienti

#### 4.1.1. Studie 1: Turnerův syndrom

Do studie bylo zahrnuto 67 dívek s TS ve věku 6-19 let z celkového počtu 82 dívek s touto diagnózou dispenzarizovaných v endokrinologických ambulancích Pediatrické kliniky FNM v Praze. Patnáct dívek bylo ze studie vyloučeno z následujících důvodů: celiakie (5), nescifické zánětlivé střevní onemocnění (2), nespolupráce pacienta při vyšetření (3) a nesouhlas se zařazením do studie (5). Klinická charakteristika pacientů je uvedena v **tabulce 3**. Pomocí klasifikace pohlavní zralosti dle Tannera byly všechny dívky v prvním stadiu vývoje prsní žlázy klasifikovány jako prepubertální, dívky ve stadiu 2 a více byly klasifikovány jako pubertální. Za konec puberty bylo považováno ukončení tělesného růstu, tj. minimálně 6 měsíců po ukončení terapie růstovým hormonem. Všechny postpubertální dívky byly ve stadiu vývoje prsu 4 nebo 5. V průběhu studie bylo 22 dívek prepubertálních, 25 dívek pubertálních a 20 dívek postpubertálních (**tab. 3**). Karyotyp dívek byl 45,X (24/67, 36%), dále byly přítomny různé formy mozaicismu (35/67, 52%) nebo měly dívky abnormální X chromozóm (8/67, 12%).

Všechny prepubertální a pubertální dívky byly léčeny rekombinantním lidským růstovým hormonem (GH). U postpubertálních dívek byla terapie ukončena v průměru 18 měsíců před zahájením studie (rozmezí 0,6-3,7 let). Iničiální dávka GH 50 µg/kg/den byla v průběhu terapie upravována podle klinického efektu (Saenger et al. 2001). Medián věku při zahájení terapie GH byl 7,0 let (rozmezí 2,4-15,4 let), medián trvání terapie byl 5,8 let (rozmezí 0,0-11,9 let).



**Tab. 3. Klinická charakteristika dívek s TS (N=67) v době měření pQCT. Uvedeny jsou průměry (SD). Porovnání se zdravou populací bylo provedeno pomocí jednovýběrového t-testu, při zamítnutí normality Shapiro-Wilkovým testem byl použit znaménkový test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí ANOVA, výsledek je vyjádřen hodnotou  $p$ .**

	prepubertální dívký (N=22)	pubertální dívký (N=25)	postpubertální dívký (N=20)	skupinový rozdíl (hodnota $p$ )
Věk (roky)	10,3 (2,2)	14,3 (1,7)	17,4 (1,2)	<0,001
Výška (cm)	132,8 (12,9)	149,8 (6,0)	157,5 (2,9)	<0,001
Výška (z-skóre)	-1,6 (1,0)***	-2,0 (0,6)***	-1,5 (0,5)***	0,107
Hmotnost (kg)	33,3 (10,4)	47,3 (7,9)	61,4 (9,2)	<0,001
Hmotnost (z-skóre)	-0,5 (1,0)*	-0,6 (0,9)**	0,3 (1,2)	0,009
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	18,4 (3,0)	21,0 (2,7)	24,8 (3,6)	<0,001
BMI (z-skóre)	0,4 (0,9)*	0,5 (0,9)*	1,1 (1,0)***	0,034
Doba trvání terapie GH (rok)	4,2 (3,2)	5,8 (3,3)	7,7 (2,1)	0,001
Doba trvání terapie estrogeny (rok)	NA	1,6 (0,7)	4,2 (1,2)	<0,001
Spontánní puberta (počet pacientek)	NA	5	1	NA

Estrogeny byly substituovány 20/25 pubertálních dívek a 19/20 postpubertálních dívek. Zbývajících 5 pubertálních dívek mělo spontánní pubertu a jedna postpubertální dívka si zachovala ovariální produkci až do dospělosti. Medián věku při zahájení estrogenní substituce byl 12,8 let (rozmezí 10,4-16,3 let) iniciální dávkou 17- $\beta$ -estradiolu 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$  podávanou 12-18 měsíců (van Pareren et al. 2003; Rosenfield et al. 2005). Dávka se poté zvýšila na 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$  po dobu dalších 12-18 měsíců,

následovalo zvýšení na 20 µg/kg/den. Po průměrné době 3 měsíců byla stejná dávka estradiolu podávána od 1. do 21. dne cyklu a doplněna o podávání 5 mg medroxyprogesteronu denně 15. - 21. den cyklu. Dívky nebyly léčeny žádnou jinou medikací se známým vlivem na kostní metabolismus kromě 15 dívek substituovaných L-thyroxinem pro autoimunitní thyroditidu. Tyto dívky byly dlouhodobě euthyroidní.

#### **4.1.2. Studie 2: Hemofilie**

Do studie bylo zařazeno 41 chlapců s hemofilií z celkového počtu 56 pacientů dispenzarizovaných v hematologické ambulanci Kliniky dětské hematologie a onkologie FNM v Praze. Patnáct chlapců bylo vyřazeno z následujících důvodů: ulcerózní kolitida (1), terapie opožděné puberty (1), nespolupráce při vyšetření (1) a nesouhlas opatrovníků se zařazením do studie (12).

Klinická charakteristika pacientů je v **tabulce 4**. Závažnost onemocnění byla klasifikována na základě sérové hladiny chybějícího koagulačního faktoru (<1%, 1-5% a 5-40% pro těžkou, středně těžkou, resp. mírnou formu). Ke kvantifikaci muskuloskeletálního postižení byl zaznamenán počet všech krvácení do svalů a hlavních kloubů (kotník, koleno, kyčel, loket a rameno) za poslední dva roky před zahájením studie, stejně jako počet krvácení, které se vyskytly na nedominantní horní končetině (místo měření kostní denzity).

**Tab. 4. Klinická charakteristika chlapců s hemofilií (N=41) v době měření pQCT. Porovnání se zdravou populací bylo provedeno pomocí jednovýběrového t-testu (z-skóre hmotnosti a BMI). Pro výšková z-skóre byl použit znaménkový test, protože byla Shapiro-Wilkovým testem zamítnuta normalita: \*  $p < 0,05$ . Byla zahrnuta všechna zdokumentovaná krvácení v posledních dvou letech.**

<b>Antropometrická data</b>	<b>průměr (SD)</b>	<b>medián (min; max)</b>
Věk (roky)	12,4 (3,3)	12,7 (6,6; 19,2)
Výška (cm)	152,7 (22,4)	148,0 (119,0; 186,0)
Výška (z-skóre)	-0,46 (1,2)*	-0,80 (-2,7; 2,0)*
Hmotnost (kg)	47,6 (20,7)	43,0 (22,0; 92,0)
Hmotnost (z-skóre)	0,034 (1,3)	0,0 (-2,1; 2,5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,4 (3,9)	18,6 (14,0; 29,8)
BMI (z-skóre)	0,24 (1,3)	0,32 (-3,27; 2,58)

<b>Charakteristika onemocnění</b>	<b>počet pacientů (%)</b>
Typ hemofilie	
- A	34 (83%)
- B	7 (17%)
Závažnost onemocnění (sérová hladina koagulačního faktoru)	
- těžká (<1%)	19 (46%)
- středně těžká (1-5%)	17 (42%)
- mírná (>5%)	5 (12%)
Způsob terapie	
- profylaktická	20 (49%)
- "on-demand"	21 (51%)
Pozitivní anamnéza fraktur	4 (10%)

Celkový počet krvácení

- <8	13 (32%)
- 8-22	15 (36%)
- >22	13 (32%)

Počet krvácení na nedominantní horní končetině (místo měření)

- 0	16 (39%)
- 1-3	16 (39%)
- >3	9 (22%)

## 4.2. Metodika měření

### 4.2.1. Antropometrické parametry

Tělesná výška byla stanovena stadiometrem s přesností na 1 mm, hmotnost byla měřena pomocí elektronické váhy s přesností na 100 g. Míry pro výšku, hmotnost a BMI byly přepočítány na věkově a pohlavně specifické směrodatné odchylky od průměru zdravé populace s využitím norem posledního národního antropometrického výzkumu (Kobzova et al. 2004).

### 4.2.2. Parametry kostní denzity a geometrie - pQCT

K měření kostní denzity na nedominantním radiu bylo použito pQCT (XCT 2000, Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Německo). Ve vzdálenosti odpovídající 4 a 65% délky předloktí měřené od procesus styloideus ulnae k olecranonu byly provedeny 2 CT skeny o tloušťce 2 mm. Kalkulace kostních parametrů byly provedeny integrovaným softwarem ve verzi 6.00 B. Stanovované kostní parametry jsou uvedeny na **obrázku 4**. Na diafýze radiu byly dále vypočítány poměr obsahu kostního minerálu (BMC) ke svalové ploše (BMC/MA) jako parametr funkční svalově-kostní jednotky a dále

relativní plocha kortikální kosti (plocha kortikální kosti/celková plocha kosti, vyjádřená v procentech). Na metafýze radia byl u pacientek s TS vypočítán Strength/Weight Index (poměr SSI a součinu délky předloktí a tělesné hmotnosti), tj. index kostní pevnosti navržený Rauchem *et al.* (Rauch *et al.* 2001). Kostní parametry byly převedeny na věkově a pohlavně specifické směrodatné odchylky od průměru zdravých dětí (z-skóre) s využitím publikovaných referenčních dat (Neu *et al.* 2001; Rauch a Schoenau 2005; Rauch a Schoenau 2008). Z-skóre byla vypočítána pomocí Coleova vzorce (Cole 1990):  $z\text{-skóre} = [\ln(\text{výsledek pacienta}/M)]/S$ , kde Ln je přirozený logaritmus, M je odpovídající věkově a pohlavně specifický průměr a S je věkově a pohlavně specifický koeficient variability. Pro parametry na diafýze radia byla vypočítána i výškově specifická z-skóre pomocí norem ze zmíněných publikací.

#### **4.3. Statistická analýza**

Všechny statistické analýzy byly prováděny v programu R (Team 2009). Porovnání se zdravou populací byla založena na jednovýběrovém t-testu nebo na znaménkovém testu. T-test byl použit tehdy, když výsledek Shapiro-Wilkova testu svědčil pro normální rozložení. Dívky s TS v různých fázích puberty byly porovnány pomocí analýzy rozptylu ANOVA, dívky s pozitivní anamnézou fraktur a dívky bez fraktur byly porovnány dvouvýběrovým t-testem. Mnohočetná regresní analýza byla použita ke zjištění závislosti logaritmovaných hodnot kostních parametrů na době trvání substituce estrogenu po adjustaci na věk a výšku. Pro významnou korelaci mezi kortikální denzitou a šíří kortikalis ( $r = 0,86$ ), která je dána efektem hraničních voxelů (Schoenau *et al.* 2002), bylo do mnohočetného regresního modelu pro kortikální denzitu jako vysvětlující proměnná kromě věku a výšky zahrnuto i z-skóre kortikální šíře. Dvouvýběrový t-test byl použit pro zjištění rozdílů mezi chlapci s těžkou hemofilií a chlapci se středně těžkou a lehkou formou, a pro zjištění rozdílů mezi chlapci léčených profylakticky a chlapci na terapii „on-demand“. ANOVA byla použita pro porovnání chlapců s hemofilií rozdělených podle počtu intramuskulárních a nitrokloubních krvácení. Korelace mezi z-skóre trabekulární denzity

a z-skóre plochy svalů a věkem byla znázorněna pomocí lineární regrese a pomocí kalkulace 95% konfidenčního pásu obsahujícího regresní křivku.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Studie 1: Turnerův syndrom

#### *Rozdíly mezi dívkami s TS v různých fázích pubertálního vývoje*

Denzitometrické parametry jsou uvedeny v **tabulce 5** v absolutních hodnotách i jako věkově a výškově specifická z-skóre zvlášť pro prepubertální, pubertální a postpubertální dívky.

Na distálním radiu (4% místo) bylo průměrné věkově specifické z-skóre celkové plochy kosti normální u prepubertálních a pubertálních dívek ( $P = 0,605$  a  $P = 0,761$ ), u postpubertálních dívek byla celková plocha kosti zvýšená ( $P = 0,003$ ). Mezi skupinami dívek byl signifikantní rozdíl v trabekulární denzitě ( $P = 0,007$ ), která byla normální u prepubertálních dívek ( $P = 0,502$ ), zatímco u pubertálních a postpubertálních byla významně snížena ( $P = 0,007$  a  $P < 0,001$ ; **obr. 6**).

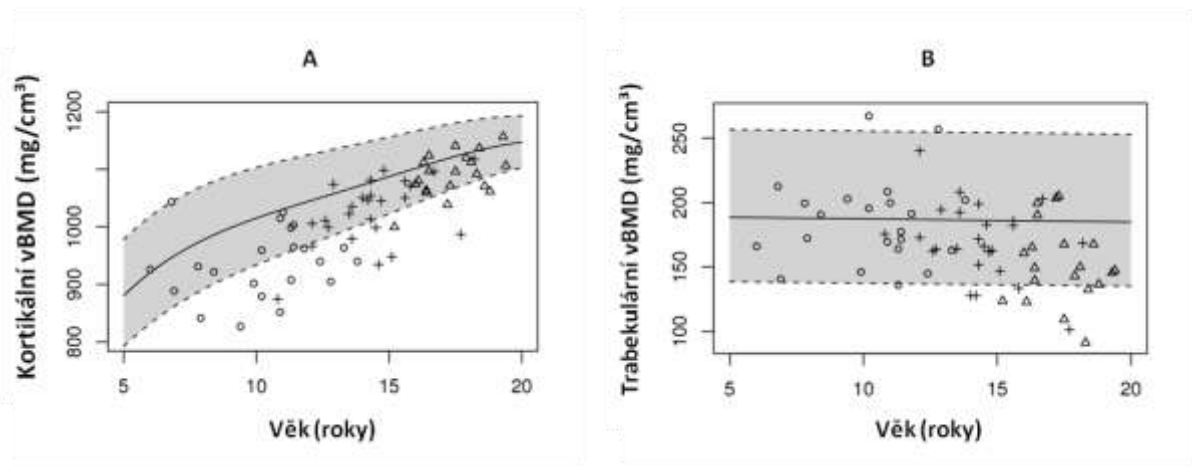
Na proximálním radiu (tj. 65% délky předloktí) bylo průměrné věkově specifické z-skóre pro celkovou plochu kosti normální u prepubertálních a postpubertálních dívek ( $P = 0,384$  a  $P = 0,826$ ), u pubertální skupiny byla celková plocha kosti snížena ( $P = 0,002$ ; **obr. 7**). S těmito výsledky kontrastovala průměrná výškově specifická z-skóre, která byla významně vyšší, ukazující zvětšenou celkovou plochu u prepubertální a postpubertální skupiny s TS ( $P = 0,024$  a  $P = 0,022$ ) a signifikantně nezměněnou plochu kosti u pubertálních dívek ( $P = 0,695$ ). Obdobné změny byly patrné i v případě plochy kortikální kosti, SSI, svalové plochy a BMC, kdy výběr věkově, resp. výškově specifické normy zásadně ovlivňoval výsledky. Pro všechny tyto kostní parametry dosahovaly dívky s TS významně lepších výsledků při zohlednění tělesné výšky (**tab. 5**). Průměrná věkově specifická z-skóre pro kortikální denzitu a kortikální šíři byla snížena ve všech skupinách ( $P < 0,001$  pro všechny skupiny; **obr. 6 a 7**).

**Tab. 5. Denzitometrické parametry dívek s TS podle stadia pubertálního vývoje. Uvedeny jsou průměry (SD). Porovnání se zdravou populací bylo provedeno pomocí jednovýběrového t-testu, při zamítnutí normality Shapiro-Wilkovým testem byl použit znaménkový test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Rozdíly v z-skórech mezi skupinami byly testovány pomocí ANOVA, výsledek je vyjádřen hodnotou  $p$ . SSI = index kostní pevnosti (Strength-Strain Index), BMC/MA = poměr obsahu kostního minerálu a plochy svalů.**

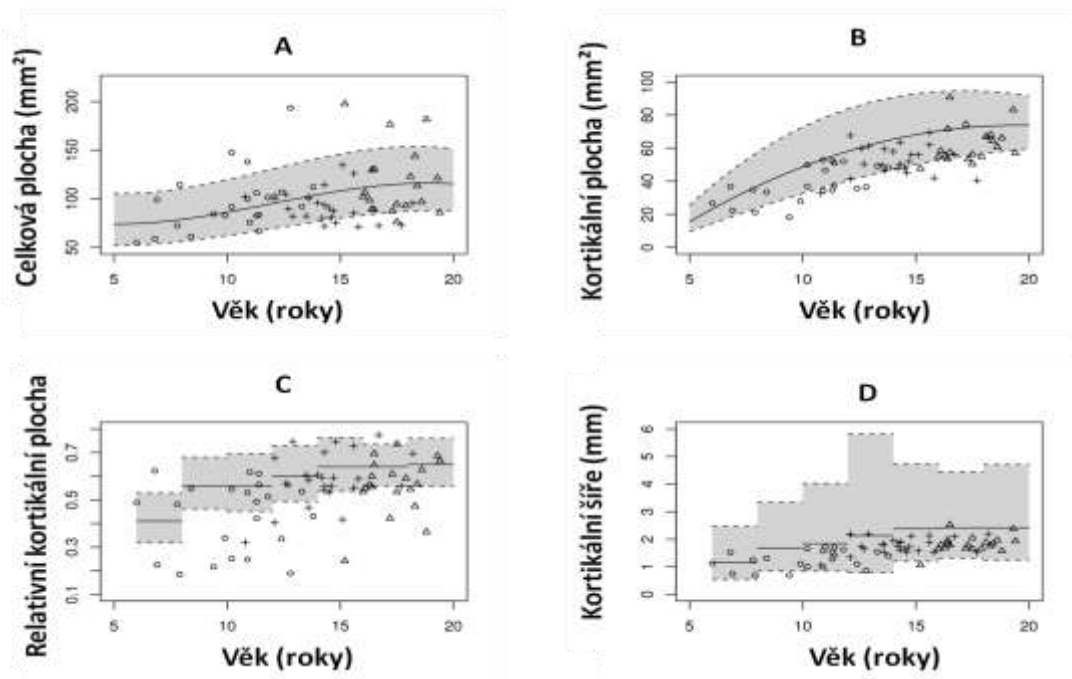
	Prepubertální skupina (N=22)		Pubertální skupina (N=25)		Postpubertální skupina (N=20)		Skupinový rozdíl (hodnota $p$ )
	hodnota	z-skóre	hodnota	z-skóre	hodnota	z-skóre	
<b>DISTÁLNÍ RADIUS</b>							
BMC (mg/mm)	59,1 (15,72)	-0,5 (1,2)	74,0 (13,8)	-1,2 (1,3)***	96,2 (12,8)	-0,6 (0,9)*	0,070
Celková vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	270,5 (34,6)	-0,5 (1,1)*	262,5 (45,0)	-1,4 (1,5)***	295,0 (44,7)	-1,3 (1,0)***	0,032
Trabekulární vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	185,4 (33,7)	-0,2(1,1)	170,0 (29,4)	-0,7 (1,1)**	152,6 (30,8)	-1,4 (1,3)***	0,007
Celková plocha (mm <sup>2</sup> )	222,0 (64,3)	-0,2 (1,5)	285,2 (52,2)	0,1 (1,1)	329,2 (42,8)	0,7 (0,9)**	0,059
SSI (mm <sup>3</sup> )	128,9 (43,0)	-	183,0 (64,3)	-	302,0 (65,2)	-	<0,001
<b>Strength/Weight Index</b>							
(mm <sup>3</sup> ·kg <sup>-1</sup> ·m <sup>-1</sup> )	21,5 (6,0)	-	18,0 (6,1)	-	22,2 (6,0)	-	0,047
<b>PROXIMÁLNÍ RADIUS</b>							



BMC (mg/mm)	54,1 (10,8)	-1,2 (1,0)***	69,1 (10,8)	-1,5 (1,2)***	83,6 (14,6)	-1,0 (1,2)**	0,239
BMC (adj. na výšku)		-0,0 (1,5)		-0,3 (1,2)		-0,1 (1,1)	0,714
Celková vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	510,8 (100,4)	-1,5 (1,6)***	652,9 (99,0)	-0,6 (1,1)*	656,8 (106,0)	-1,0 (1,5)**	0,098
Celková vBMD (adj. na výšku)		-0,9 (1,5)**		-0,1 (1,0)		-0,5 (1,4)	0,103
Kortikální vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	936,1 (59,2)	-2,0 (1,7)***	1025,5 (57,2)	-1,6 (1,5)***	1090,6 (37,7)	-1,0 (1,2)***	0,102
Celková plocha (mm <sup>2</sup> )	96,6 (32,1)	0,3 (1,6)	92,6 (16,5)	-0,9 (1,3)**	116,9 (34,5)	-0,1 (1,9)	0,035
Celková plocha (adj. na výšku)		1,0 (1,8)*		0,1 (1,3)		1,0 (1,8)*	0,110
Kortikální plocha (mm <sup>2</sup> )	38,2 (10,8)	-1,3 (1,3)***	53,4 (9,3)	-1,4 (1,1)***	62,3 (11,1)	-1,2 (1,2)***	0,867
Kortikální plocha (adj. na výšku)		-0,1 (1,2)		-0,1 (0,9)		0,1 (0,9)	0,681
Relativní kortikální plocha	0,4 (0,2)	-2,7 (3,9)**	0,6 (0,1)	-0,8 (2,0)	0,6 (0,1)	-2,1 (3,0)**	0,100
Kortikální šíře (mm)	1,3 (0,3)	-0,8 (0,7)***	1,8 (0,3)	-0,7 (0,4)***	1,8 (0,3)	-0,9 (0,5)***	0,465
SSI (mm <sup>3</sup> )	136,5 (47,3)	-0,7 (1,2)*	175,0 (39,4)	-1,3 (1,2)***	239,1 (64,4)	-0,6 (1,3)	0,106
SSI (adj. na výšku)		1,0 (1,2)***		0,5 (1,2)		1,2 (1,3)***	0,105
Plocha svalů (mm <sup>2</sup> )	1886,2 (438,9)	-0,9 (1,2)**	2240,4 (292,1)	-1,3 (1,1)***	2439,2 (277,6)	-1,3 (1,0)***	0,400
Plocha svalů (adj. na výšku)		1,5 (2,3)**		0,6 (2,4)		0,4 (2,0)	0,257
BMC/MA	2,9 (0,4)	-0,5 (1,0)*	3,1 (0,4)	-0,3 (1,1)	3,4 (0,5)	0,2 (1,2)	0,175



Obr. 6. *Individuální hodnoty kortikální (A) a trabekulární (B) vBMD na radiu u dívek s TS. Kolečka představují hodnoty prepubertálních, křížky pubertálních a trojúhelníky postpubertálních dívek. Plnou čarou je znázorněn průměr, šedým pásem  $\pm 2$  SD pro zdravé dívky.*



Obr. 7. *Individuální hodnoty celkové (A) a kortikální (B) plochy kosti, relativní kortikální plochy (C) a kortikální šíře (D) na proximálním radiu u dívek s TS. Kolečka představují hodnoty prepubertálních, křížky pubertálních a trojúhelníky postpubertálních dívek. Plnou čarou je znázorněn průměr, šedým pásem  $\pm 2$  SD pro zdravé dívky.*

### *Vliv estrogenní substituce na kostní parametry u TS*

Nebyly nalezeny signifikantní asociace mezi dobou trvání substituce estrogyeny a kostními parametry na distálním radiu.

Doba trvání substituce estrogyeny byla pozitivně asociována s parametry na proximálním radiu: o jeden rok delší substituce vedla k nárůstu BMC o 6,2% (95% CI 1,5-10,9%), poměru BMC/MA o 4,9% (95% CI 0,70-9,2%), SSI o 9,0% (95% CI 1,7-16,3%) a kortikální denzity o 1,0% (95% CI 0,020-2,0%).

### *Rozdíly v kostních parametrech v závislosti na anamnéze fraktur u TS*

Frakturu v osobní anamnéze uvedlo 14/67 (21%) dívek s TS. Celkový počet fraktur byl 26 (13x zápěstí, 10x předloktí, 1x bérce, 1x prst a 1x netraumatická vertebrální fraktura). Tři dívky měly během života 2 fraktury, jedna dívka uvedla 3 fraktury a dvě dívky uvedly každá čtyři fraktury.

Dívky s TS s pozitivní anamnézou fraktur měly nižší celkovou denzitu kosti na distálním radiu ve srovnání s dívkami bez fraktur (**tab. 6**). V žádném jiném kostním parametru se tyto dvě skupiny dívek významně nelišily, stejně tak se nelišily v délce či věku při zahájení substituce estrogyeny.

**Tab. 6. Rozdíly v antropometrických a densitometrických parametrech mezi dívkami s TS s ohledem na anamnézu fraktur. Uvedeny jsou průměry (SD).**

**Rozdíly mezi skupinami byly testovány dvouvýběrovým t-testem, výsledek je vyjádřen hodnotou p. BMC = obsah kostního minerálu; vBMD = volumetrická kostní densita; SSI = index kostní pevnosti (Strength-Strain Index).**

	Dívky bez fraktury (N=53)		Dívky s frakturou (N=14)		Skupinový rozdíl (hodnota p)
	hodnota	z-skóre	hodnota	z-skóre	
<b>ANTROPOMETRIE</b>					
Věk (roky)	13,9 (3,3)		14,0 (3,7)		0,901
Výška (cm)	146,4 (12,4)		147,0 (16,0)		0,889
<b>DISTÁLNÍ RADIUS</b>					
BMC (mg/mm)	75,5 (19,7)	-0,7 (1,2)	76,6 (23,5)	-0,9 (1,3)	0,740
Celková vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	279,4 (42,5)	-0,9 (1,3)	257,5 (43,7)	-1,7 (1,1)	0,039
Celková plocha (mm <sup>2</sup> )	272,0 (63,8)	0,0 (1,3)	298,9 (83,0)	0,7 (1,1)	0,071
Trabekulární vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	171,6 (33,7)	-0,7 (1,3)	163,0 (32,9)	-0,9 (1,1)	0,434
SSI (mm <sup>3</sup> )	203,3 (91,4)	-	191,2 (91,6)	-	0,662
Strength/Weight Index (mm <sup>3</sup> ·kg <sup>-1</sup> ·m <sup>-1</sup> )	20,5 (5,9)	-	20,1 (7,6)	-	0,824

## 5.2. Studie 2: Hemofilie

### *Denzita kostního minerálu, geometrie radia a plocha svalů u hemofilie*

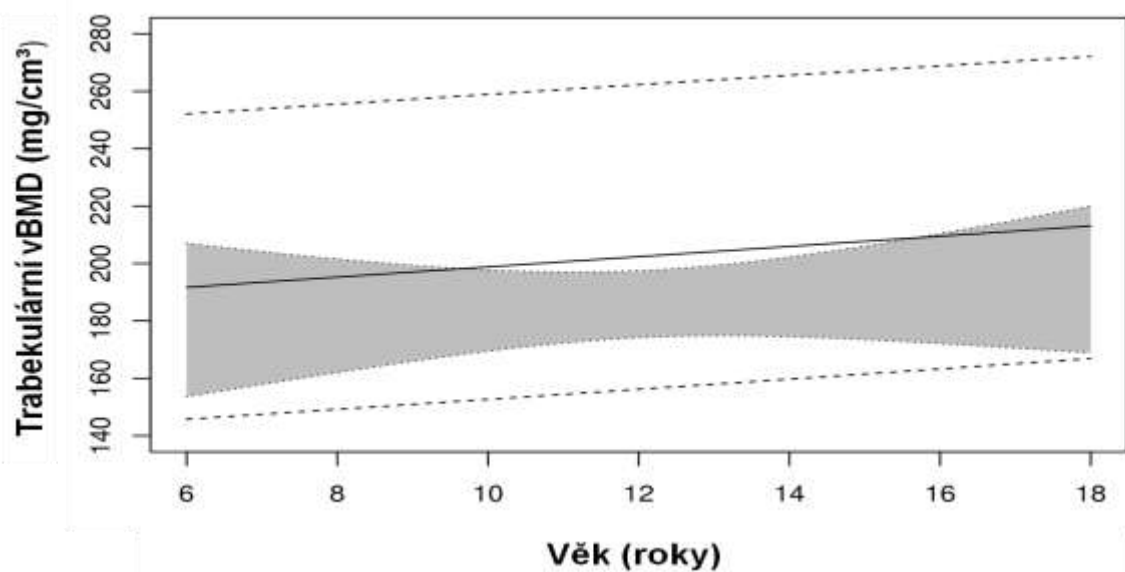
Parametry měřené pomocí pQCT jsou souhrnně uvedeny jako průměry absolutních hodnoty a z-skóre v **tabulce 7**.

Na distálním radiu (4% délky předloktí) měli chlapci s hemofilií snížené BMC a trabekulární denzitu ve srovnání s věkově specifickými referenčními daty ( $P = 0,007$  pro oba parametry), zatímco celková plocha kosti byla normální. Trabekulární denzita byla snížena v průběhu celého dětství bez závislosti na věku (jednoduchá lineární regrese, z-skóre pro trabekulární denzitu vs. věk,  $P = 0,7$ , **obr. 8**).

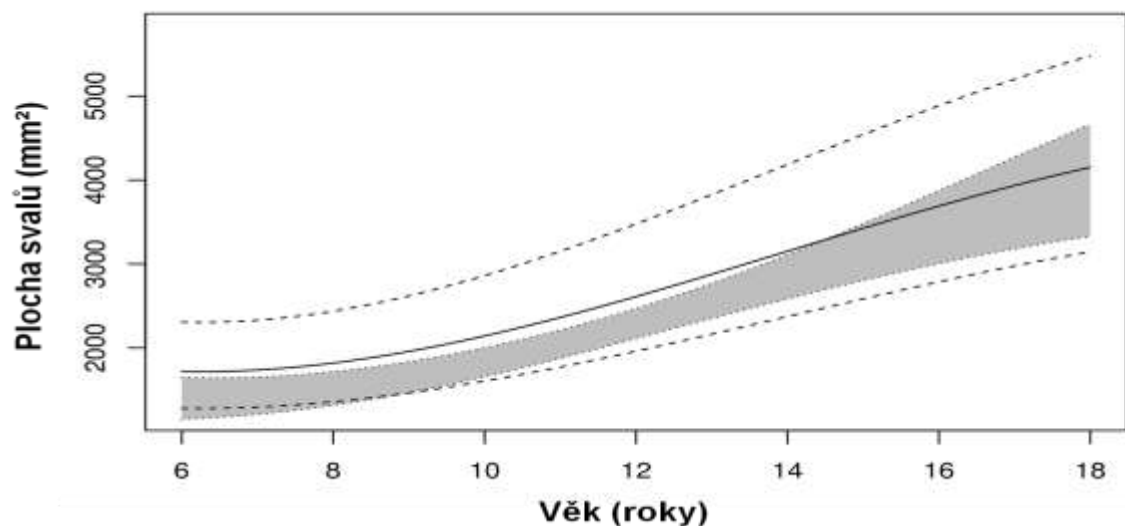
Na diafýze (65% místo) byla průměrná věkově specifická z-skóre pro BMC, celkovou plochu kosti a kortikální šíři snížena ( $P = 0,04$ ;  $P = 0,02$ ; resp.  $P = 4 \times 10^{-4}$ ). Vzhledem ke snížené tělesné výšce chlapců s hemofilií ve srovnání s českými vrstevníky byla provedena korekce na výšku: průměrná výškově specifická z-skóre pro BMC i celkovou plochu kosti byla v normě. Ačkoli se plocha kortikální kosti nelišila od normy, kortikální denzita byla zvýšená ( $P = 0,02$ ). Zatímco index kostní pevnosti SSI byl normální, plocha svalů byla významně snížena ( $P = 10^{-4}$ ). Vzhledem k tomu, že BMC bylo normální, vedla nízká plocha svalů ke zvýšenému poměru BMC/MA ( $P = 8 \times 10^{-4}$ ). Podobně jako trabekulární denzita se z-skóre plochy svalů významně neměnilo s věkem (jednoduchá lineární regrese,  $P = 0,11$ , **obr. 9**).

**Tab. 7. Kostní parametry měřené pomocí pQCT na radiu u chlapců s hemofilií. Uvedeny jsou průměry (SD). Porovnání s normou bylo provedeno pomocí jednovýběrového t-testu, při zamítnutí normality Shapiro-Wilkovým testem byl použit znaménkový test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . BMC = obsah kostního minerálu, vBMD = volumetrická kostní denzita, SSI = index kostní pevnosti (strength-strain index), BMC/MA = poměr obsahu kostního minerálu ke svalové ploše.**

	hodnota (SD)	z-skóre (SD)
<b>DISTÁLNÍ RADIUS</b>		
BMC (mg/mm)	82,5 (33,9)	-0,54 (1,2)**
Celková plocha (mm <sup>2</sup> )	277,7 (90,4)	-0,32 (1,2)
Trabekulární vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	191,3 (32,3)	-0,55 (1,2)**
<b>PROXIMÁLNÍ RADIUS</b>		
BMC (mg/mm)	76,1 (23,9)	-0,38 (1,1)*
BMC (adj. na výšku)	---	-0,085 (0,94)
Celková plocha (mm <sup>2</sup> )	101,4 (28,1)	-0,44 (1,2)*
Celková plocha (adj. na výšku)	---	-0,13 (1,2)
Kortikální plocha (mm <sup>2</sup> )	59,1 (19,8)	-0,33 (1,1)
Kortikální plocha (adj. na výšku)	---	-0,24 (0,91)
Kortikální vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	1044,1 (56,1)	0,40 (1,1)*
Kortikální šíře (mm)	1,84 (0,46)	-0,37 (0,64)***
SSI (mm <sup>3</sup> )	212,3 (94,0)	-0,33 (1,2)
SSI (adj. na výšku)	---	-0,055 (1,0)
Plocha svalů (mm <sup>2</sup> )	2526,3 (1015,9)	-0,87 (1,3)***
Plocha svalů (adj. na výšku)	---	-0,96 (1,1)***
BMC/MA	3,13 (0,47)	0,60 (1,1)***



Obr. 8. Trabekulární vBMD je snižena nezávisle na věku chlapců s hemofilií. Plná čára představuje průměr a přerušované čáry  $\pm 2SD$  pro zdravé chlapce, šedý pás s 95% pravděpodobností pokrývá celou regresní přímku ( $\beta = -0.0293$ ,  $P = 0.702$ ).



Obr. 9. Plocha svalů na proximálním předloktí je snižena nezávisle na věku chlapců s hemofilií. Plná čára představuje průměr a přerušované čáry  $\pm 2SD$  pro zdravé chlapce, šedý pás s 95% pravděpodobností pokrývá celou regresní přímku ( $\beta = 0.0993$ ,  $P = 0.108$ ).

### *Vliv klinických a laboratorních markerů tíže hemofilie na kostní parametry*

Tíže hemofilie vyjádřená sérovou hladinou chybějícího koagulačního faktoru nebyla významně asociována se žádným stanovovaným parametrem kostí (**tab. 8**). Dvacet z našich 41 pacientů bylo na profylaktické terapii rekombinantním koagulačním faktorem, ostatní měli terapii „on demand“, tj. pouze při úrazu a při příznacích krvácení do kloubu. Způsob terapie neměl významný vliv na zjišťované parametry kostní denzity a geometrie (průměrná z-skóre trabekulární denzity  $-0,23 \pm 1,1$  a  $-0,85 \pm 1,3$ ;  $P = 0,107$  a průměrná z-skóre kortikální šíře  $-0,16 \pm 0,58$  a  $-0,57 \pm 0,65$ ;  $P = 0,070$ , pro chlapce na profylaktické terapii, resp. pro chlapce na terapii „on-demand“) ani na parametry svalové funkce (z-skóre  $-0,56 \pm 1,3$  a  $-1,2 \pm 1,3$ ;  $P = 0,13$ , profylaktická terapie, resp. terapie „on-demand“).

Pro testování závislosti kostních parametrů na počtu krvácení byli pacienti rozděleni do tří skupin podle četnosti dokumentovaných nitrosvalových a nitrokloubních krvácení za poslední dva roky. Rozdělení do tří skupin bylo arbitrární s ohledem na rovnoměrné rozložení pacientů (**tab. 4**). Průměrný věk pacientů byl ve všech třech skupinách srovnatelný ( $13,1 \pm 3,1$ ,  $11,6 \pm 3,8$  a  $12,6 \pm 3,2$  let, pro skupinu s méně než 8 krvácení, 8-22 krvácení, resp. více než 22 krvácení,  $P = 0,35$ ). Průměrná z-skóre trabekulární denzity byla  $-0,79 \pm 1,1$ ,  $-0,20 \pm 1,4$ , resp.  $-0,71 \pm 1,2$ , mezi skupinami nebyl významný rozdíl ( $P = 0,39$ ). Průměrná z-skóre svalové plochy byla  $-1,3 \pm 0,97$ ,  $-0,73 \pm 1,4$ , resp.  $-0,57 \pm 1,5$ , bez významného rozdílu mezi skupinami ( $P = 0,28$ ). Žádný jiný parametr kostní denzity, geometrie či svalové funkce se nelišil s ohledem na místo či frekvenci krvácení.

Čtyři chlapci měli pozitivní anamnézu fraktur: tři měli jednu frakturu (radius, fibula a bilaterální fraktura předloktí) a jeden pacient prodělal 2 fraktury (bérec a předloktí). U chlapců s hemofilií nebyly nalezeny žádné rozdíly v kostních parametrech s ohledem na anamnézu fraktur, data nejsou zobrazena.



**Tab. 8. Rozdíly v antropometrických a denzitometrických parametrech mezi chlapci s hemofilii s ohledem na tíži onemocnění. Uvedeny jsou průměrné hodnoty (SD). Porovnání s normou bylo provedeno pomocí jednovýběrového t-testu: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Rozdíly mezi skupinami byly testovány dvouvýběrovým t-testem, výsledek je znázorněn pomocí hodnoty  $p$ . BMC = obsah kostního minerálu, vBMD = volumetrická kostní denzita, SSI = index kostní pevnosti (strength-strain index), BMC/MA = poměr obsahu kostního minerálu ke svalové ploše.**

	Těžká hemofilie (N=19)	Mírná a středně těžká hemofilie (N=22)	Skupinový rozdíl (hodnota $p$ )
Věk (roky)	11,5 (3,5)	13,2 (3,1)	0,104
Výška (cm)	148,0 (22,2)	156,8 (22,2)	0,212
Výška (z-skóre)	-0,42 (1,2)	-0,50 (1,3)	0,825
Hmotnost (kg)	43,4 (19,0)	51,2 (21,9)	0,225
Hmotnost (z-skóre)	0,037 (1,4)	0,032 (1,3)	0,990
<b>DISTÁLNÍ RADIUS</b>			
BMC (z-skóre)	-0,68 (1,2)*	-0,42 (1,3)	0,496
Celková plocha (z-skóre)	-0,33 (1,2)	-0,31 (1,2)	0,969
Trabekulární vBMD (z-skóre)	-0,85 (1,1)**	-0,28 (1,3)	0,136

PROXIMÁLNÍ RADIUS			
BMC (z-skóre)	-0,38 (0,97)	-0,39 (1,3)	0,978
BMC (z-skóre adj. na výšku)	-0,059 (0,91)	-0,11 (0,99)	0,872
Celková plocha (z-skóre)	-0,34 (1,1)	-0,54 (1,3)	0,595
Celková plocha (z-skóre adj. na výšku)	-0,051 (1,3)	-0,20 (1,1)	0,698
Kortikální plocha (z-skóre)	-0,34 (1,1)	-0,32 (1,1)	0,948
Kortikální plocha (z-skóre adj. na výšku)	-0,26 (1,0)	-0,22 (0,83)	0,889
Kortikální vBMD (z-skóre)	0,22 (1,1)	0,55 (1,0)*	0,325
Kortikální šíře (z-skóre)	-0,45 (0,82)*	-0,31 (0,44)**	0,516
SSI (z-skóre)	-0,23 (1,1)	-0,42 (1,3)	0,624
SSI (z-skóre adj. na výšku)	-0,052 (1,1)	-0,058 (0,94)	0,986
Plocha svalů (z-skóre)	-0,72 (1,2)*	-1,0 (1,4)**	0,490
Plocha svalů (z-skóre adj. na výšku)	-0,90 (1,2)**	-1,0 (1,1)***	0,737
BMC/MA	0,50 (1,2)	0,70 (1,0)**	0,573

## 6. DISKUZE

### 6.1. Studie 1: Turnerův syndrom

V této studii byly pomocí pQCT popsány změny kostní denzity a geometrie radia u dívek s TS v různých fázích pubertálního vývoje, byl testován vliv doby trvání estrogenní terapie na parametry kostní pevnosti a tyto parametry byly též porovnány s ohledem na anamnézu fraktur. Bylo zjištěno, že: 1) plocha kortikální kosti a šíře kortikalis na diafýze radia jsou významně sniženy u všech tří skupin dívek s TS, zatímco celková plocha radia je normální s výjimkou pubertálních dívek, u kterých je snižena. Po zohlednění tělesné výšky však byla celková plocha radia zvětšená (kromě pubertálních dívek, kde byla normální), zatímco plocha kortikální kosti byla u všech tří skupin dívek normální, 2) kortikální denzita je snižena u všech tří skupin, 3) trabekulární denzita je normální u prepubertálních dívek, ale je snižena u pubertální a postpubertální skupiny, 4) délka podávání estrogenní substituce pozitivně koreluje s kortikální denzitou a indexem kostní pevnosti, a 5.) celková volumetrická denzita na metafýze radia je u dívek s pozitivní anamnézou fraktur nižší než u dívek bez fraktur.

#### *Geometrie radia u dívek s TS*

Geometrické kostní parametry jsou významně závislé na tělesné výšce. Proto je nutné tyto parametry u dětí s růstovou retardací hodnotit s ohledem na tělesné rozměry, což platí i pro dívky s Turnerovým syndromem. Z výsledků naší práce vyplývá, že celková plocha diafýzy radia v příčné rovině je po zohlednění tělesné výšky u prepubertálních a postpubertálních dívek s TS zvětšená. Zvětšení příčného rozměru kosti vede ke zvýšení rezistence v ohybu a torzi, což je podstatou fyziologického procesu adaptace dlouhých kostí na zvýšenou mechanickou zátěž působenou kontrakcí kosterního svalstva (Frost 1998; Seeman 2008). Vzhledem ke snížené kvalitě kortikální kosti (snížené kortikální denzitě) u dívek s TS

Ize zvětšení celkové plochy radia interpretovat jako výsledek fyziologické adaptace kosti na mechanickou zátěž s cílem snížit kostní fragilitu. V souladu s touto hypotézou je nález zvýšeného indexu kostní pevnosti SSI u prepubertálních a postpubertálních dívek s TS. Odlišné výsledky pubertálních dívek s TS lze vysvětlit tím, že při porovnávání se zdravými dívkami (věkově i výškově specifickou normou) vždy porovnáváme dívky v různých pubertálních stadiích. Pubertální dívky s TS jsou totiž hyperestrinní v porovnání se stejně vysokými zdravými kontrolami (tedy prepubertálními dívkami), naopak v porovnání se stejně starými zdravými dívkami jsou hypoestrinní. Wang *et al.* popsal, že sérová hladina estradiolu koreluje u zdravých pubertálních dívek negativně s délkou vnitřního obvodu kortikalis na diafýze tibie, avšak po menarché byla nalezena pozitivní korelace s celkovou plochou kosti (Wang *et al.* 2006). Z těchto výsledků lze dovést, že malé dávky estrogenu podávané pubertálním dívkám s TS působí pozitivně především na endokortikální povrch kosti, což se projeví rozšířením kortikalis, a tím i zvětšením relativní plochy kortikální kosti. Vyšší dávky estrogenu podávané postpubertálním dívkám s TS pak stimulují především periostální povrch projevující se zvětšením celkové plochy kosti.

#### *Kortikální denzita a šíře kortikalis*

Snížená kortikální denzita u dívek s TS podporuje hypotézu selektivního deficitu kortikální kosti u těchto pacientek, kterou zmiňují předchozí studie (Bakalov *et al.* 2003; Holroyd *et al.* 2010). Bakalov *et al.* popsal sníženou plošnou BMD na distálním radiu (místo s převahou kortikální kosti) pomocí DXA u dospělých pacientek s TS (Bakalov *et al.* 2003), podobně Holroyd *et al.* zjistil sníženou kortikální denzitu na radiu pomocí pQCT u postpubertálních dívek s TS (Holroyd *et al.* 2010). Při interpretaci těchto nálezů je třeba mít na paměti, že v důsledku „efektu hraničních voxelů“ jsou hodnoty kortikální denzity zjištěné pomocí pQCT ovlivněny šíří kortikalis (Schoenau *et al.* 2002). Tento efekt může způsobit falešné podhodnocení kortikální denzity zvláště u jedinců s tenkou kortikalis, což platí i pro dívky s TS. Čím tenčí

je kortikalis, tím větší je proporcionální zastoupení voxelů zahrnujících jak kost, tak i měkké tkáně v oblasti periostu a endostu. Snížené hodnoty kortikální denzity u pacientek s TS (popsané naší studií i předešlými pracemi) jsou tak zřejmě částečně způsobeny tenkou kortikalis. Proto jsme použili korekční vzorec profesora Rittwegera, který byl zaveden za účelem eliminace efektu hraničních voxelů (Rittweger et al. 2004). Po úpravě pomocí tohoto vzorce byly hodnoty kortikální denzity u našich dívek s TS naopak oproti normě zvýšené (průměrná z-skóre 1,1; 0,7 a 1,4 pro prepubertální, pubertální, resp. postpubertální skupinu;  $P < 0.01$  pro všechny skupiny). Testování správnosti použitého algoritmu pomocí syntetických fantomů prokázalo spíše nepatrné podhodnocení skutečných hodnot kortikální denzity než nadhodnocení (Rittweger et al. 2004). Proto je nepravděpodobné, že by použití zmíněného algoritmu vedlo ke zvýšeným hodnotám kortikální denzity u našich dívek s TS. Nelze však na druhou stranu vyloučit efekt tzv. "tvrzení" neboli homogenizace rentgenového paprsku, který u větších kostí kortikální denzitu podhodnocuje, což by mohlo vysvětlit naše nálezy. Míra skutečného snížení kortikální denzity u dívek s TS tak zůstává neobjasněna. Hlavní změny kortikální kosti u TS však představují rozdíly v geometrických parametrech, nikoli v kostní denzitě.

### *Trabekulární denzita*

Estrogeny mají významný pozitivní vliv na trámčitou kost. Sníženou trabekulární denzitu u pubertálních a postpubertálních dívek s TS tak lze považovat za důsledek hypogonadizmu. Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují normální plošnou BMD lumbální páteře korigovanou na tělesnou výšku u prepubertálních dívek s TS, ale nedostatečný nárůst kostní hmoty obratlů během puberty (Ross et al. 1991; Shaw et al. 1997). Podobné výsledky byly též pozorovány u hypogonadálních jedinců pomocí QCT (Nanao et al. 2002). V kontrastu s našimi výsledky pak dvě studie využívající pQCT u postpubertálních dívek s TS ukázaly normální hodnoty trabekulární denzity na radiu (Bechtold et al.

2001; Holroyd et al. 2010). Pro tuto diskrepanci nemáme jasné vysvětlení. Můžeme pouze spekulovat o typu a/nebo dávce estrogenů, které odlišují studii Bechtold *et al.* (Bechtold et al. 2001) (estradiolvalerát, 2 mg/den) a studii naší (17- $\beta$ -estradiol, 1,2 mg/den), nebo o rozdílném průměrném věku postpubertálních pacientek v těchto studiích (19,5 $\pm$ 2,3 vs. 17,2 $\pm$ 1,3 let), design předkládané práce nám nedovolil detailnější analýzu.

### *Estrogeny a jejich vliv na kost u TS*

V naší studii byla doba trvání substituce estrogeny pozitivně asociována s kortikální denzitou, BMC, poměrem BMC/MA a SSI na diafýze radia. To je v souladu s výsledky placebem kontrolované studie u TS popisující asociaci mezi substitucí estrogeny a nárůstem kostní denzity ve střední části falangů prstů ruky, tj. místo s převahou kortikální kosti (van Teunenbroek et al. 1995). Naše výsledky tak podporují hypotézu, že estrogeny mají pozitivní modulační vliv na metabolismus kortikální kosti (Sumnik et al. 2006), čímž zvyšují její pevnost. To je v souladu s epidemiologickými daty ukazujícími devatenásobně zvýšené riziko fraktur u estrogeny nesubstituovaných žen s TS starších 45 let v porovnání se zdravou populací (Landin-Wilhelmsen et al. 1999).

### *Pevnost kosti a fraktury u TS*

U žen s TS byl popsán zvýšený výskyt fraktur ve srovnání se zdravou populací (Landin-Wilhelmsen et al. 1999; Gravholt et al. 2003). Zajímavým nálezem bylo, že významně odlišná od běžné populace byla pouze frekvence výskytu fraktury předloktí (relativní riziko 1,9) (Gravholt et al. 2003). Měření kvality a geometrie kosti pomocí pQCT, které se standardně provádí právě na předloktí, je tak velmi slibnou

metodou pro hodnocení kostní pevnosti u TS. V naší studii jsme jako první ukázali, že dívky s TS, které měly alespoň jednu frakturu v anamnéze, měly nižší celkovou denzitu na distálním radiu (metafýze) ve srovnání s dívkami bez fraktur. Celková denzita v tomto místě představuje kombinaci denzity vnější kortikální kosti a vnitřní kosti trabekulární. Vzhledem k tomu, že jsme nenalezli rozdíl v trabekulární denzitě s ohledem na anamnézu fraktur, byla nízká celková denzita u dívek s prodělanou frakturou zřejmě způsobená nižší kortikální denzitou.

Limitací studie je její průřezový design. Naše pozorování týkající se pozitivního vlivu estrogenů na parametry kostní pevnosti u TS je nutné ověřit pomocí prospektivních studií a potvrdit tak kauzální mechanismus anebo objevit zatím skryté faktory, které pevnost kostí u TS ovlivňují.

## 6.2. Studie 2: Hemofilie

Tato studie jako první pomocí pQCT potvrzuje předpokládaný mechanismus snížené kostní denzity u chlapců s hemofilií, který spočívá v suboptimální mechanické zátěži kostí. Zjistili jsme, že tito pacienti mají sníženou trabekulární denzitu a tenkou kortikalis. Nejvýraznější změnou ve srovnání se zdravými vrstevníky byla snížená plocha svalů na proximálním předloktí. Sledované kostní a svalové parametry nebyly u našich pacientů ovlivněny sérovou hladinou chybějícího koagulačního faktoru, typem terapie ani četností nitrosvalového a nitrokloubního krvácení.

### *Kostní denzita, geometrie radia a plocha svalů u hemofilie*

Snížená kostní denzita byla již dříve u dětí s hemofilií popsána, ale pouze pomocí stanovení plošné BMD měřené metodou DXA (průměrná z-skóre denzity lumbální páteře byla -1,6 (Tlacuilo-Parra et al. 2008), -0,9 (Barnes et al. 2004) a -0,7 (Abdelrazik et al. 2007)). Výsledek tohoto vyšetření však odráží pouze množství kostní hmoty a ignoruje geometrické rozměry kosti, které zásadně ovlivňují celkovou pevnost kosti (Martin et al. 2004; Szulc et al. 2006; Kalkwarf et al. 2011). V naší studii jako první popisujeme, že kostní porucha u pacientů s hemofilií spočívá ve snížené trabekulární denzitě (**obr. 8**). Vzhledem k tomu, že obratel se skládá převážně z trabekulární kosti, je tento výsledek v souladu s předchozími citovanými studii.

Geometrické parametry na diafýze radia (celková plocha kosti a šíře kortikalis) byly ve srovnání s normou snížené. Vzhledem k menší tělesné výšce chlapců s hemofilií jsme naše výsledky korigovali na výšku; po této adjustaci byla celková plocha kosti v normě.



Důležitým nálezem u našich pacientů s hemofilii byl normální index kostní pevnosti SSI. Tento index představuje modul odporu průřezu (charakterizuje pevnost elongovaných předmětů na základě rozložení materiálu kolem své dlouhé osy) vážený denzitou každého voxelu, a tím je kombinací geometrického ukazatele (modul odporu průřezu) s ukazatelem kvality kortikální kosti (kortikální denzita). Vzhledem k tomu, že byly oba tyto parametry v normě, byl index kostní pevnosti též normální. Na základě našich výsledků lze uzavřít, že radius je u dětí a adolescentů s hemofilii adekvátně adaptován na mechanickou zátěž.

### *Příčiny kostní poruchy u hemofilie*

Nejčastěji zmiňovaným a předpokládaným mechanismem snížené kostní denzity u pacientů s hemofilii je snížená či porušená mobilita těchto pacientů. Bylo popsáno, že prevalence sedavého životního stylu u dětí s hemofilii je třikrát větší ve srovnání se zdravými vrstevníky (Tlacuilo-Parra et al. 2008), v jiné studii měly děti s hemofilii sníženou svalovou sílu (Falk et al. 2005). Naopak trvání a intenzita dynamické fyzikální aktivity korelovala pozitivně s aBMD lumbální páteře u dospělých pacientů s hemofilii na dlouhodobé profylaktické terapii (Khawaji et al. 2010). V naší studii popisujeme pomocí pQCT jako první sníženou plochu svalstva na předloktí u chlapců s hemofilii, a to bez závislosti na věku (**obr. 9**). V souladu s fyziologií vývoje svalově-kostní jednotky vede dlouhodobá sarkopenie k „osteopenii“. Ačkoliv nelze přímo srovnávat relativně mírné snížení fyzické aktivity u dětí s hemofilii s naprostou imobilitou u pacientů po úrazu míchy, přesto mohou být publikované výsledky u paraplegiků instruktivní: po průměrné délce trvání paraplegie po dobu 5,7 let měli tito pacienti sníženou svalovou hmotu dolních končetin o 43% a současně sníženou kostní hmotu o 28% (Dionysiotis et al. 2009). Na metafyzách dlouhých kostí bylo snížení ve srovnání s diafyzami výraznější (Eser et al. 2004). Podobné místně specifické rozdíly byly patrné i u zdravých dobrovolníků po pětatřicetidenním znehybnění na lůžku

(Rittweger et al. 2009). Vzhledem k tomu, že metafýzy se převážně skládají z trabekulární kosti, snížená trabekulární denzita zjištěná u našich pacientů je v souladu s těmito studiemi. Trabekulární denzita byla u paraplegiků po dosažení nové rovnováhy kostního metabolismu vskutku snížena (-73%), zatímco kortikální denzita se významně nezměnila (-3%) (Eser et al. 2004). Lze tak dovodit, že sarkopenie způsobená omezením fyzické aktivity u našich pacientů s hemofilii vedla sekundárně k nízké trabekulární denzitě.

Pro vztah mezi závažností hemofilie a kostní denzitou existují rozporuplná data. Nedávno publikovaná metaanalýza (Iorio et al. 2010) popsala asociaci mezi těžkou hemofií a nízkou aBMD lumbální páteře. Jako jeden z možných mechanismů autoři zmiňují vyšší frekvenci krvácivých epizod u pacientů s těžkou formou onemocnění. Opakovaná nitrokloubní krvácení mohou vést k hemofilické artropatii, způsobit omezení mobility, jehož důsledkem je úbytek svalové hmoty. Méně je známo o kvalitě kostí u lehčích forem hemofilie, protože většina studií zahrnovala pouze pacienty s těžkou formou (včetně výše zmíněné metaanalýzy). Abdelrazik *et al.* popsal inverzní korelaci mezi aBMD a závažností hemofilie u egyptských dětí, do studie však bylo zahrnuto relativně málo pacientů (9 pacientů s těžkou formou, 21 s lehkou formou onemocnění) (Abdelrazik et al. 2007). Naopak Khawaji *et al.* nenalezl významné rozdíly v aBMD mezi dospělými pacienty s těžkou a lehkou formou hemofilie (Khawaji et al. 2009), což je v souladu s našimi výsledky. Jedním z možných vysvětlení těchto kontroverzních výsledků mohou být odlišnosti v terapii, protože dlouhodobá profylaktická substituce koagulačních faktorů vedla k zachování kvality kosti u pacientů s hemofií (Khawaji et al. 2009).

### *Riziko fraktur u hemofilie*

Důležitá otázka významu snížené trabekulární denzity ve vztahu ke zvýšenému riziku fraktur zůstává stále nezodpovězena. Ačkoliv je pevnost dlouhých kostí ovlivněna především kvalitou kortikální kosti a její geometrií (Muller et al. 2003; Kalkwarf et al. 2011) (oba tyto parametry byly u našich pacientů normální), byla překvapivě v recentních studiích právě nízká trabekulární denzita asociována s pozitivní anamnézou fraktur prodělaných během dětství a adolescence (Darelid et al. 2010; Farr et al. 2011). Doposud nebyla publikována žádná studie popisující rozdíl v incidenci fraktur u pacientů s hemofilii ve srovnání se zdravou populací. Naše studie nebyla primárně zaměřená na zjištění rozdílu v incidenci fraktur, velmi malý počet chlapců s pozitivní anamnézou fraktur v našem souboru limituje přímou aplikaci zjištěných výsledků v klinické praxi.

## 7. ZÁVĚRY

U doposud největšího publikovaného souboru dívek s Turnerovým syndromem vyšetřovaných pomocí pQCT jsme prokázali, že geometrie i denzita kostního minerálu měřená na radiu se liší jak od zdravé populace, tak v závislosti na stadiu pubertálního vývoje. Naše výsledky jsou v souladu s hypotézou, že změny v geometrii radia jsou u TS sekundární reakcí na deficit kortikální kosti, účelem je zachování adekvátní pevnosti kosti. Tyto změny tak představují výsledek mechanismu adaptace na mechanickou zátěž, což je v souladu s teorií mechanostatu a konceptem funkční svalově-kostní jednotky. Estrogeny modulují metabolickou aktivitu kortikální kosti a jsou nutné k fyziologickému nárůstu relativní plochy kortikální kosti během puberty u dívek, dále se podílejí na udržení normální trabekulární denzity. Substituce estrogeny u dívek s TS vede k nárůstu kortikální kostní hmoty a denzity a indexu kostní pevnosti, na udržení normální trabekulární denzity však současné dávky a schéma substituce zřejmě nestačí. Neprokázali jsme souvislost mezi trabekulární denzitou ani geometrickými parametry na diafýze radia a výskytem fraktur u dívek s TS.

U chlapců s hemofilii se nám jako prvním podařilo pomocí pQCT popsat asociaci mezi sníženou kostní denzitou a nízkou plochou svalů, což je v souladu s hypotézou sekundární osteoporózy u těchto pacientů. Mechanismus nízké kostní denzity spočívá ve snížené mechanické zátěži kosti zapříčiněné nejspíše omezením sportovních aktivit, což vede k úbytku svalové tkáně (nízké ploše svalů předloktí). Úbytek svalové tkáně vede k reaktivnímu snížení trabekulární denzity a ztenčení kortikalis, pevnost radia však zůstává v normě. Není doposud známo, zda u pacientů s hemofilii pozorované změny kostních parametrů skutečně vedou ke zvýšenému riziku fraktur. Vliv dlouhodobě omezené fyzické aktivity a případných opakovaných krvácení do svalů a kloubů na tyto kostní parametry v dospělém věku a jejich vztah k riziku fraktur je třeba ověřit pomocí následných longitudinálních studií.

## 8. SOUHRN

Pacientky s Turnerovým syndromem (TS) mají zvýšené riziko fraktur a sníženou denzitu kostí, pacienti s těžkou hemofilií mají sníženou kostní denzitu. Etiologie těchto změn nebyla doposud zcela objasněna ani u jedné ze dvou zmíněných chorob. Cílem našich studií bylo popsat kostní denzitu a geometrické parametry radia pomocí nové metody periferní kvantitativní CT denzitometrie (pQCT) a zjistit vztah těchto parametrů k estrogenní substituci u TS a k laboratorním a klinickým ukazatelům závažnosti onemocnění u hemofilie.

Pomocí pQCT bylo změřeno 67 dívek s TS (medián věku 14,3 let, rozmezí 6,0-19,4) a 42 chlapců s hemofilií (medián věku 12,7 let, rozmezí 6,6-19,2). Výsledky denzitometrie byly porovnány s publikovanými referenčními daty.

Dívky s TS měli sníženou kortikální denzitu a tenkou kortikalis. Tyto parametry byly pozitivně asociovány s délkou terapie estrogény. Trabekulární denzita byla normální u prepubertálních dívek s TS, po pubertě však byla významně snižena, asociace s délkou estrogenní terapie nebyla nalezena. Chlapci s hemofilií měli sníženou trabekulární denzitu a plochu svalů na předloktí, parametry nebyly ovlivněny sérovou hladinou faktoru VIII, resp. IX ani počtem krvácení do svalů a kloubů.

Zatímco u dívek s TS je snižena kostní denzita pravděpodobně způsobena deficitem estrogenů, u chlapců s hemofilií je primárním etiologickým faktorem nízké kostní denzity sarkopenie.

Klíčová slova: kostní denzita, pevnost kosti, Turnerův syndrom, hemofilie, estrogény, sarkopenie

## 8. SUMMARY

Patients with Turner syndrome (TS) have increased fracture risk and decreased bone density, patients with severe hemophilia have low bone density. The etiology of these changes hasn't been completely elucidated in any of the two diseases. Our aims were to assess bone density and geometry at the radius using a new method peripheral quantitative CT densitometry (pQCT) and to describe associations between densitometry parameters and estrogen treatment in TS and laboratory as well as clinical markers of disease severity in haemophilia.

Sixty-seven girls with TS (median age 14.3 years, range 6.0-19.4) and 42 boys with haemophilia (median age 12.7 years, range 6.6-19.2) have been measured using peripheral quantitative CT at the radius. The results have been compared to published reference data.

Girls with TS had decreased cortical bone density and thinner cortex. These parameters were positively correlated to the length of estrogen treatment. Trabecular bone density was normal in prepubertal girls but it was decreased after puberty. There was no association between trabecular bone density and the estrogen treatment. Boys with haemophilia had decreased trabecular density and low muscle area at the forearm. Densitometry parameters were influenced neither by the clotting factor VIII/IX level nor by the frequency of intra-articular and intramuscular bleeding.

While the decrease in bone density in girls with TS is probably caused by estrogen deficiency, the primary cause of bone deficit in boys with haemophilia is sarcopenia.

Keywords: bone density, bone strength, Turner syndrome, haemophilia, estrogen treatment, sarcopenia

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abdelrazik, N., Reda, M., El-Ziny, M. and Rabea, H. "Evaluation of bone mineral density in children with hemophilia: Mansoura University children hospital (MUCH) experience, Mansoura, Egypt." Hematology (2007) 12(5): 431-7.
2. Albrand, G., Munoz, F., Sornay-Rendu, E., DuBoeuf, F. and Delmas, P. D. "Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study." Bone (2003) 32(1): 78-85.
3. Bachrach, L. K. "Assessing bone health in children: who to test and what does it mean?" Pediatr Endocrinol Rev (2005) 2 Suppl 3: 332-6.
4. Bakalov, V. K., Axelrod, L., Baron, J., Hanton, L., Nelson, L. M., Reynolds, J. C., Hill, S., Troendle, J. and Bondy, C. A. "Selective reduction in cortical bone mineral density in turner syndrome independent of ovarian hormone deficiency." J Clin Endocrinol Metab (2003) 88(12): 5717-22.
5. Bakalov, V. K., Chen, M. L., Baron, J., Hanton, L. B., Reynolds, J. C., Stratakis, C. A., Axelrod, L. E. and Bondy, C. A. "Bone mineral density and fractures in Turner syndrome." Am J Med (2003) 115(4): 259-64.
6. Barnes, C., Wong, P., Egan, B., Speller, T., Cameron, F., Jones, G., Ekert, H. and Monagle, P. "Reduced bone density among children with severe hemophilia." Pediatrics (2004) 114(2): e177-81.
7. Baron, R. and Rawadi, G. "Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton." Endocrinology (2007) 148(6): 2635-43.
8. Bayer, M. and Kutilek, S. "Ultrasound transmission through the Os calcis in children: which side should we measure?" Calcif Tissue Int (1997) 61(6): 441-2.
9. Bechtold, S., Rauch, F., Noelle, V., Donhauser, S., Neu, C. M., Schoenau, E. and Schwarz, H. P. "Musculoskeletal analyses of the forearm in young women with Turner syndrome: a study using peripheral quantitative computed tomography." J Clin Endocrinol Metab (2001) 86(12): 5819-23.
10. Binkley, T. L. and Specker, B. L. "pQCT measurement of bone parameters in young children: validation of technique." J Clin Densitom (2000) 3(1): 9-14.
11. Binkley, T. L. and Specker, B. L. "Muscle-bone relationships in the lower leg of healthy pre-pubertal females and males." J Musculoskelet Neuronal Interact (2008) 8(3): 239-43.
12. Boutroy, S., Bouxsein, M. L., Munoz, F. and Delmas, P. D. "In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography." J Clin Endocrinol Metab (2005) 90(12): 6508-15.
13. Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R. P. "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med (2002) 346(20): 1513-21.

14. Braun, M. J., Meta, M. D., Schneider, P. and Reiners, C. "Clinical evaluation of a high-resolution new peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) scanner for the bone densitometry at the lower limbs." Phys Med Biol (1998) 43(8): 2279-94.
15. Carter, D. R., Bouxsein, M. L. and Marcus, R. "New approaches for interpreting projected bone densitometry data." J Bone Miner Res (1992) 7(2): 137-45.
16. Clark, E. M., Ness, A. R., Bishop, N. J. and Tobias, J. H. "Association between bone mass and fractures in children: a prospective cohort study." J Bone Miner Res (2006) 21(9): 1489-95.
17. Cole, T. J. "The LMS method for constructing normalized growth standards." Eur J Clin Nutr (1990) 44(1): 45-60.
18. Cranney, A., Jamal, S. A., Tsang, J. F., Josse, R. G. and Leslie, W. D. "Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women." Cmaj (2007) 177(6): 575-80.
19. Darelid, A., Ohlsson, C., Rudang, R., Kindblom, J. M., Mellstrom, D. and Lorentzon, M. "Trabecular volumetric bone mineral density is associated with previous fracture during childhood and adolescence in males: the GOOD study." J Bone Miner Res (2010) 25(3): 537-44.
20. Dionyssiotis, Y., Lyritis, G. P., Papaioannou, N., Papagelopoulos, P. and Thomaides, T. "Influence of neurological level of injury in bones, muscles, and fat in paraplegia." J Rehabil Res Dev (2009) 46(8): 1037-44.
21. Duncan, R. L. and Turner, C. H. "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." Calcif Tissue Int (1995) 57(5): 344-58.
22. Eser, P., Frotzler, A., Zehnder, Y., Wick, L., Knecht, H., Denoth, J. and Schiessl, H. "Relationship between the duration of paralysis and bone structure: a pQCT study of spinal cord injured individuals." Bone (2004) 34(5): 869-80.
23. Falk, B., Portal, S., Tiktinsky, R., Zigel, L., Weinstein, Y., Constantini, N., Kenet, G., Eliakim, A. and Martinowitz, U. "Bone properties and muscle strength of young haemophilia patients." Haemophilia (2005) 11(4): 380-6.
24. Farr, J. N., Tomas, R., Chen, Z., Lisse, J. R., Lohman, T. G. and Going, S. B. "Lower trabecular volumetric BMD at metaphyseal regions of weight-bearing bones is associated with prior fracture in young girls." J Bone Miner Res (2011) 26(2): 380-7.
25. Forwood, M. R. "Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo." J Bone Miner Res (1996) 11(11): 1688-93.
26. Fricke, O. and Schoenau, E. "The 'Functional Muscle-Bone Unit': probing the relevance of mechanical signals for bone development in children and adolescents." Growth Horm IGF Res (2007) 17(1): 1-9.
27. Fricke, O., Tuttlewski, B., Schwahn, B. and Schoenau, E. "Speed of sound: relation to geometric characteristics of bone in children, adolescents, and adults." J Pediatr (2005) 146(6): 764-8.



28. Frost, H. M. "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal." Anat Rec (1987) 219(1): 1-9.
29. Frost, H. M. "The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents." Bone Miner (1987) 2(2): 73-85.
30. Frost, H. M. "From Wolff's law to the mechanostat: a new "face" of physiology." J Orthop Sci (1998) 3(5): 282-6.
31. Gallacher, S. J., Deighan, C., Wallace, A. M., Cowan, R. A., Fraser, W. D., Fenner, J. A., Lowe, G. D. and Boyle, I. T. "Association of severe haemophilia A with osteoporosis: a densitometric and biochemical study." Q J Med (1994) 87(3): 181-6.
32. Genant, H. K. and Jiang, Y. "Advanced imaging assessment of bone quality." Ann N Y Acad Sci (2006) 1068: 410-28.
33. Gerstner, G., Damiano, M. L., Tom, A., Worman, C., Schultz, W., Recht, M. and Stopeck, A. T. "Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia." Haemophilia (2009) 15(2): 559-65.
34. Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M. L., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C. A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R. and Warman, M. L. "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell (2001) 107(4): 513-23.
35. Gravholt, C. H., Lauridsen, A. L., Brixen, K., Mosekilde, L., Heickendorff, L. and Christiansen, J. S. "Marked disproportionality in bone size and mineral, and distinct abnormalities in bone markers and calcitropic hormones in adult turner syndrome: a cross-sectional study." J Clin Endocrinol Metab (2002) 87(6): 2798-808.
36. Gravholt, C. H., Vestergaard, P., Hermann, A. P., Mosekilde, L., Brixen, K. and Christiansen, J. S. "Increased fracture rates in Turner's syndrome: a nationwide questionnaire survey." Clin Endocrinol (Oxf) (2003) 59(1): 89-96.
37. Gustavsson, A., Olsson, T. and Nordstrom, P. "Rapid loss of bone mineral density of the femoral neck after cessation of ice hockey training: a 6-year longitudinal study in males." J Bone Miner Res (2003) 18(11): 1964-9.
38. Haapasalo, H., Kannus, P., Sievanen, H., Pasanen, M., Uusi-Rasi, K., Heinonen, A., Oja, P. and Vuori, I. "Effect of long-term unilateral activity on bone mineral density of female junior tennis players." J Bone Miner Res (1998) 13(2): 310-9.

39. Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C. "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell (2005) 8(5): 727-38.
40. Holroyd, C. R., Davies, J. H., Taylor, P., Jameson, K., Rivett, C., Cooper, C. and Dennison, E. M. "Reduced cortical bone density with normal trabecular bone density in girls with Turner syndrome." Osteoporos Int (2010) 21(12): 2093-9.
41. Iorio, A., Fabbriani, G., Marcucci, M., Brozzetti, M. and Filipponi, P. "Bone mineral density in haemophilia patients. A meta-analysis." Thromb Haemost (2010) 103(3): 596-603.
42. Jamal, S. A., Gilbert, J., Gordon, C. and Bauer, D. C. "Cortical pQCT measures are associated with fractures in dialysis patients." J Bone Miner Res (2006) 21(4): 543-8.
43. Johnell, O., Kanis, J. A., Oden, A., Johansson, H., De Laet, C., Delmas, P., Eisman, J. A., Fujiwara, S., Kroger, H., Mellstrom, D., Meunier, P. J., Melton, L. J., 3rd, O'Neill, T., Pols, H., Reeve, J., Silman, A. and Tenenhouse, A. "Predictive value of BMD for hip and other fractures." J Bone Miner Res (2005) 20(7): 1185-94.
44. Kalkwarf, H. J., Laor, T. and Bean, J. A. "Fracture risk in children with a forearm injury is associated with volumetric bone density and cortical area (by peripheral QCT) and areal bone density (by DXA)." Osteoporos Int (2011) 22(2): 607-16.
45. Kanis, J. A., Melton, L. J., 3rd, Christiansen, C., Johnston, C. C. and Khaltsev, N. "The diagnosis of osteoporosis." J Bone Miner Res (1994) 9(8): 1137-41.
46. Karlsson, M. K., Linden, C., Karlsson, C., Johnell, O., Obrant, K. and Seeman, E. "Exercise during growth and bone mineral density and fractures in old age." Lancet (2000) 355(9202): 469-70.
47. Katsarou, O., Terpos, E., Chatzismalis, P., Provelengios, S., Adraktas, T., Hadjidakis, D., Kouramba, A. and Karafoulidou, A. "Increased bone resorption is implicated in the pathogenesis of bone loss in hemophiliacs: correlations with hemophilic arthropathy and HIV infection." Ann Hematol (2010) 89(1): 67-74.
48. Khawaji, M., Akesson, K. and Berntorp, E. "Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density." Haemophilia (2009) 15(1): 261-6.
49. Khawaji, M., Astermark, J., Akesson, K. and Berntorp, E. "Physical activity for prevention of osteoporosis in patients with severe haemophilia on long-term prophylaxis." Haemophilia (2010) 16(3): 495-501.
50. Khosla, S., Riggs, B. L., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., McDaniel, L. J., Holets, M., Peterson, J. M. and Melton, L. J., 3rd "Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment." J Bone Miner Res (2006) 21(1): 124-31.
51. Kobzova, J., Vignerova, J., Blaha, P., Krejcovsky, L. and Riedlova, J. "The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001." Cent Eur J Public Health (2004) 12(3): 126-30.

52. Krieg, M. A., Barkmann, R., Gonnelli, S., Stewart, A., Bauer, D. C., Del Rio Barquero, L., Kaufman, J. J., Lorenc, R., Miller, P. D., Olszynski, W. P., Poiana, C., Schott, A. M., Lewiecki, E. M. and Hans, D. "Quantitative ultrasound in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions." J Clin Densitom (2008) 11(1): 163-87.
53. Kroger, H., Kotaniemi, A., Vainio, P. and Alhava, E. "Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy x-ray absorptiometry." Bone Miner (1992) 17(1): 75-85.
54. Lage, A. Z., Brandao, C. A., Mendes, J. R., Huayllas, M. K., Liberman, B., Mendonca, B. B., Costa, E. M., Verreschi, I. T. and Lazaretti-Castro, M. "High degree of discordance between three-dimensional and two-dimensional lumbar spine bone mineral density in Turner's syndrome." J Clin Densitom (2005) 8(4): 461-6.
55. Landin-Wilhelmsen, K., Bryman, I., Windh, M. and Wilhelmsen, L. "Osteoporosis and fractures in Turner syndrome-importance of growth promoting and oestrogen therapy." Clin Endocrinol (Oxf) (1999) 51(4): 497-502.
56. Leonard, M. B., Propert, K. J., Zemel, B. S., Stallings, V. A. and Feldman, H. I. "Discrepancies in pediatric bone mineral density reference data: potential for misdiagnosis of osteopenia." J Pediatr (1999) 135(2 Pt 1): 182-8.
57. Li, J., Burr, D. B. and Turner, C. H. "Suppression of prostaglandin synthesis with NS-398 has different effects on endocortical and periosteal bone formation induced by mechanical loading." Calcif Tissue Int (2002) 70(4): 320-9.
58. Li, J., Duncan, R. L., Burr, D. B. and Turner, C. H. "L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo." J Bone Miner Res (2002) 17(10): 1795-800.
59. Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S. P., Swain, P. M., Zhao, S. C., Eustace, B., Lappe, M. M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M. G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K. M., Anisowicz, A., Morales, A. J., Lomedico, P. T., Recker, S. M., Van Eerdewegh, P., Recker, R. R. and Johnson, M. L. "A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait." Am J Hum Genet (2002) 70(1): 11-9.
60. Litzenberger, J. B., Kim, J. B., Tummala, P. and Jacobs, C. R. "Beta1 integrins mediate mechanosensitive signaling pathways in osteocytes." Calcif Tissue Int (2010) 86(4): 325-32.
61. Macdonald, H., Kontulainen, S., Petit, M., Janssen, P. and McKay, H. "Bone strength and its determinants in pre- and early pubertal boys and girls." Bone (2006) 39(3): 598-608.
62. Macdonald, H. M., Nishiyama, K. K., Kang, J., Hanley, D. A. and Boyd, S. K. "Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: a population-based HR-pQCT study." J Bone Miner Res (2011) 26(1): 50-62.

63. Marin, F., Gonzalez-Macias, J., Diez-Perez, A., Palma, S. and Delgado-Rodriguez, M. "Relationship between bone quantitative ultrasound and fractures: a meta-analysis." J Bone Miner Res (2006) 21(7): 1126-35.
64. Martin, D. E., Severns, A. E. and Kabo, J. M. "Determination of mechanical stiffness of bone by pQCT measurements: correlation with non-destructive mechanical four-point bending test data." J Biomech (2004) 37(8): 1289-93.
65. Miyahara, K., Wang, D. H., Mori, K., Takahashi, K., Miyatake, N., Wang, B. L., Takigawa, T., Takaki, J. and Ogino, K. "Effect of sports activity on bone mineral density in wheelchair athletes." J Bone Miner Metab (2008) 26(1): 101-6.
66. Modlesky, C. M., Subramanian, P. and Miller, F. "Underdeveloped trabecular bone microarchitecture is detected in children with cerebral palsy using high-resolution magnetic resonance imaging." Osteoporos Int (2008) 19(2): 169-76.
67. Molgaard, C., Thomsen, B. L., Prentice, A., Cole, T. J. and Michaelsen, K. F. "Whole body bone mineral content in healthy children and adolescents." Arch Dis Child (1997) 76(1): 9-15.
68. Muller, M. E., Webber, C. E. and Bouxsein, M. L. "Predicting the failure load of the distal radius." Osteoporos Int (2003) 14(4): 345-52.
69. Muller, R., Hildebrand, T., Hauselmann, H. J. and Ruegsegger, P. "In vivo reproducibility of three-dimensional structural properties of noninvasive bone biopsies using 3D-pQCT." J Bone Miner Res (1996) 11(11): 1745-50.
70. Nair, A. P., Jijina, F., Ghosh, K., Madkaikar, M., Shrikhande, M. and Nema, M. "Osteoporosis in young haemophiliacs from western India." Am J Hematol (2007) 82(6): 453-7.
71. Nanao, K., Tsuchiya, Y., Kotoh, S. and Hasegawa, Y. "Low vertebral cancellous bone density in peripubertal girls with Turner's syndrome and boys with hypogonadism." J Pediatr Endocrinol Metab (2002) 15(9): 1537-42.
72. Nayak, S., Olkin, I., Liu, H., Grabe, M., Gould, M. K., Allen, I. E., Owens, D. K. and Bravata, D. M. "Meta-analysis: accuracy of quantitative ultrasound for identifying patients with osteoporosis." Ann Intern Med (2006) 144(11): 832-41.
73. Neer, R. M. "Bone loss across the menopausal transition." Ann N Y Acad Sci (2010) 1192: 66-71.
74. Neu, C. M., Manz, F., Rauch, F., Merkel, A. and Schoenau, E. "Bone densities and bone size at the distal radius in healthy children and adolescents: a study using peripheral quantitative computed tomography." Bone (2001) 28(2): 227-32.
75. Neu, C. M., Rauch, F., Manz, F. and Schoenau, E. "Modeling of cross-sectional bone size, mass and geometry at the proximal radius: a study of normal bone development using peripheral quantitative computed tomography." Osteoporos Int (2001) 12(7): 538-47.
76. Özkaya, N. and Nordin, M. (1998). Fundamentals of Biomechanics. New York Springer

77. Prentice, A., Parsons, T. J. and Cole, T. J. "Uncritical use of bone mineral density in absorptiometry may lead to size-related artifacts in the identification of bone mineral determinants." Am J Clin Nutr (1994) 60(6): 837-42.
78. Rauch, F. "Material matters: a mechanostat-based perspective on bone development in osteogenesis imperfecta and hypophosphatemic rickets." J Musculoskelet Neuronal Interact (2006) 6(2): 142-6.
79. Rauch, F., Bailey, D. A., Baxter-Jones, A., Mirwald, R. and Faulkner, R. "The 'muscle-bone unit' during the pubertal growth spurt." Bone (2004) 34(5): 771-5.
80. Rauch, F., Neu, C., Manz, F. and Schoenau, E. "The development of metaphyseal cortex - implications for distal radius fractures during growth." Journal of Bone and Mineral Research (2001) 16(8): 1547-1555.
81. Rauch, F., Plotkin, H., DiMeglio, L., Engelbert, R. H., Henderson, R. C., Munns, C., Wenkert, D. and Zeitler, P. "Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2007 Pediatric Official Positions." J Clin Densitom (2008) 11(1): 22-8.
82. Rauch, F. and Schoenau, E. "Peripheral quantitative computed tomography of the distal radius in young subjects - new reference data and interpretation of results." J Musculoskelet Neuronal Interact (2005) 5(2): 119-26.
83. Rauch, F. and Schoenau, E. "Peripheral quantitative computed tomography of the proximal radius in young subjects--new reference data and interpretation of results." J Musculoskelet Neuronal Interact (2008) 8(3): 217-26.
84. Rittweger, J., Michaelis, I., Giehl, M., Wusecke, P. and Felsenberg, D. "Adjusting for the partial volume effect in cortical bone analyses of pQCT images." J Musculoskelet Neuronal Interact (2004) 4(4): 436-41.
85. Rittweger, J., Simunic, B., Bilancio, G., De Santo, N. G., Cirillo, M., Biolo, G., Pisot, R., Eiken, O., Mekjavic, I. B. and Narici, M. "Bone loss in the lower leg during 35 days of bed rest is predominantly from the cortical compartment." Bone (2009) 44(4): 612-8.
86. Rosenfield, R. L., Devine, N., Hunold, J. J., Mauras, N., Moshang, T., Jr. and Root, A. W. "Salutary effects of combining early very low-dose systemic estradiol with growth hormone therapy in girls with Turner syndrome." J Clin Endocrinol Metab (2005) 90(12): 6424-30.
87. Ross, J. L., Long, L. M., Feuille, P., Cassorla, F. and Cutler, G. B., Jr. "Normal bone density of the wrist and spine and increased wrist fractures in girls with Turner's syndrome." J Clin Endocrinol Metab (1991) 73(2): 355-9.
88. Saenger, P., Wikland, K. A., Conway, G. S., Davenport, M., Gravholt, C. H., Hintz, R., Hovatta, O., Hultcrantz, M., Landin-Wilhelmsen, K., Lin, A., Lippe, B., Pasquino, A. M., Ranke, M. B., Rosenfeld, R. and Silberbach, M. "Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome." J Clin Endocrinol Metab (2001) 86(7): 3061-9.

89. Seeman, E. "Pathogenesis of bone fragility in women and men." Lancet (2002) 359(9320): 1841-50.
90. Seeman, E. "Bone quality: the material and structural basis of bone strength." J Bone Miner Metab (2008) 26(1): 1-8.
91. Seeman, E. and Delmas, P. D. "Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility." N Engl J Med (2006) 354(21): 2250-61.
92. Shaw, N. J., Rehan, V. K., Husain, S., Marshall, T. and Smith, C. S. "Bone mineral density in Turner's syndrome--a longitudinal study." Clin Endocrinol (Oxf) (1997) 47(3): 367-70.
93. Schoenau, E. "From mechanostat theory to development of the "Functional Muscle-Bone-Unit"." J Musculoskelet Neuronal Interact (2005) 5(3): 232-8.
94. Schoenau, E., Neu, C. M., Beck, B., Manz, F. and Rauch, F. "Bone mineral content per muscle cross-sectional area as an index of the functional muscle-bone unit." J Bone Miner Res (2002) 17(6): 1095-101.
95. Schoenau, E., Neu, C. M., Mokov, E., Wassmer, G. and Manz, F. "Influence of puberty on muscle area and cortical bone area of the forearm in boys and girls." J Clin Endocrinol Metab (2000) 85(3): 1095-8.
96. Schoenau, E., Neu, C. M., Rauch, F. and Manz, F. "The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence." J Clin Endocrinol Metab (2001) 86(2): 613-8.
97. Schoenau, E., Neu, C. M., Rauch, F. and Manz, F. "Gender-specific pubertal changes in volumetric cortical bone mineral density at the proximal radius." Bone (2002) 31(1): 110-3.
98. Schoenau, E., Werhahn, E., Schiedermaier, U., Mokow, E., Schiessl, H., Scheidhauer, K. and Michalk, D. "Influence of muscle strength on bone strength during childhood and adolescence." Horm Res (1996) 45 Suppl 1: 63-6.
99. Siu, W. S., Qin, L. and Leung, K. S. "pQCT bone strength index may serve as a better predictor than bone mineral density for long bone breaking strength." J Bone Miner Metab (2003) 21(5): 316-22.
100. Sumnik, Z., Land, C., Coburger, S., Neu, C., Manz, F., Hrach, K. and Schoenau, E. "The muscle-bone unit in adulthood: influence of sex, height, age and gynecological history on the bone mineral content and muscle cross-sectional area." J Musculoskelet Neuronal Interact (2006) 6(2): 195-200.
101. Szulc, P., Claustrat, B., Marchand, F. and Delmas, P. D. "Increased risk of falls and increased bone resorption in elderly men with partial androgen deficiency: the MINOS study." J Clin Endocrinol Metab (2003) 88(11): 5240-7.

102. Szulc, P., Munoz, F., Duboeuf, F., Marchand, F. and Delmas, P. D. "Low width of tubular bones is associated with increased risk of fragility fracture in elderly men--the MINOS study." Bone (2006) 38(4): 595-602.
103. R Development Core Team. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." (2009) R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
104. Tlacuilo-Parra, A., Morales-Zambrano, R., Tostado-Rabago, N., Esparza-Flores, M. A., Lopez-Guido, B. and Orozco-Alcala, J. "Inactivity is a risk factor for low bone mineral density among haemophilic children." Br J Haematol (2008) 140(5): 562-7.
105. van den Bergh, J. P., Noordam, C., Ozyilmaz, A., Hermus, A. R., Smals, A. G. and Otten, B. J. "Calcaneal ultrasound imaging in healthy children and adolescents: relation of the ultrasound parameters BUA and SOS to age, body weight, height, foot dimensions and pubertal stage." Osteoporos Int (2000) 11(11): 967-76.
106. van Pareren, Y. K., de Muinck Keizer-Schrama, S. M., Stijnen, T., Sas, T. C., Jansen, M., Otten, B. J., Hoorweg-Nijman, J. J., Vulsma, T., Stokvis-Brantsma, W. H., Rouwe, C. W., Reeser, H. M., Gerver, W. J., Gosen, J. J., Rongen-Westerlaken, C. and Drop, S. L. "Final height in girls with turner syndrome after long-term growth hormone treatment in three dosages and low dose estrogens." J Clin Endocrinol Metab (2003) 88(3): 1119-25.
107. van Rijn, R. R. and van Kuijk, C. "Bone densitometry in children." Semin Musculoskelet Radiol (2002) 6(3): 233-40.
108. van Teunenbroek, A., Mulder, P., de Muinck Keizer-Schrama, S., van Kuijk, C., Grashuis, J., van Bodegom, J. W. and Drop, S. "Radiographic absorptiometry of the phalanges in healthy children and in girls with Turner syndrome." Bone (1995) 17(1): 71-8.
109. Walker, L. M., Publicover, S. J., Preston, M. R., Said Ahmed, M. A. and El Haj, A. J. "Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells in response to mechanical strain." J Cell Biochem (2000) 79(4): 648-61.
110. Wang, Q., Alen, M., Nicholson, P. H., Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Ohlsson, C., Suominen, H. and Cheng, S. "Differential effects of sex hormones on peri- and endocortical bone surfaces in pubertal girls." J Clin Endocrinol Metab (2006) 91(1): 277-82.
111. Wehrli, F. W., Gomberg, B. R., Saha, P. K., Song, H. K., Hwang, S. N. and Snyder, P. J. "Digital topological analysis of in vivo magnetic resonance microimages of trabecular bone reveals structural implications of osteoporosis." J Bone Miner Res (2001) 16(8): 1520-31.
112. Weinbaum, S., Cowin, S. C. and Zeng, Y. "A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses." J Biomech (1994) 27(3): 339-60.
113. Wren, T. A., Liu, X., Pitukcheewanont, P. and Gilsanz, V. "Bone densitometry in pediatric populations: discrepancies in the diagnosis of osteoporosis by DXA and CT." J Pediatr (2005) 146(6): 776-9.

## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### 10.1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

#### a) s IF:

- O. Soucek, J. Lebl, M. Snajderova, S. Kolouskova, M. Rocek, Z. Hlavka, O. Cinek, J. Rittweger, Z. Sumnik (2011) Bone geometry and volumetric bone mineral density in girls with Turner syndrome of different pubertal stages, *Clin Endo*, 74(4): 445-452.  
(DOI: 10.1111/j.1365-2265.2010.03955.x)  
IF=3,323
- O. Soucek, V. Komrska, Z. Hlavka, O. Cinek, M. Rocek, D. Zemkova, J. Lebl, Z. Sumnik (2012) Boys with haemophilia have low trabecular bone mineral density and sarcopenia, but normal bone strength at the radius, *Haemophilia*, 18(2): 222-8.  
(DOI: 10.1111/j.1365-2516.2011.02616.x)  
IF=2,364

#### b) bez IF

- O. Souček, Z. Šumník, J. Lebl (2009) Kostní denzita a parametry kostní pevnosti: jejich role v hodnocení rizika fraktur u dětí, *DMEV*, 12(2): 85-92.
- Z.Šumník, O.Souček (2011) Diagnostika osteoporózy u dětí, *Pediatr. Praxi*, 12(4): 232-4.

### 10.2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

#### a) s IF

- nejsou

#### b) bez IF

- Z. Šumník, O. Souček (2008) Terapie růstovým hormonem a její vliv na složení těla dětí a adolescentů, *Pediatr. Praxi*, 9(6): 376-9.



### 10.3. Abstrakta

- O. Soucek, Z. Sumnik, M. Snajderova, S. Kolouskova, M. Rocek, Z. Hlavka, J. Lebl (2009) Early administration of growth hormone increases bone density in girls with Turner syndrome, *Horm Res*, 72(Suppl. 3): 466. (DOI:10.1159/000239668), *IF=2,044*
- O. Soucek, Z. Sumnik, M. Snajderova, S. Kolouskova, M. Rocek, Z. Hlavka and J. Lebl (2009) Bone mineral density is low even in prepubertal girls with Turner syndrome: A pQCT study, *Bone*, 45(Suppl. 2): S77-S78. (DOI:10.1016/j.bone.2009.04.097), *IF=4,601*
- O. Soucek, V. Komrska, Z. Hlavka, O. Cinek, M. Rocek, D. Zemkova, J. Lebl, Z. Sumnik (2011) Boys with haemophilia have low trabecular volumetric BMD and sarcopenia, but normal bone strength at the radius, *Horm Res Paediatr*, 76(Suppl. 2): 152. (DOI:10.1159/000334327), *IF=2,044*
- O. Souček, J. Lebl, D. Zemková, J. Matysková, Z. Šumník (2011) Využití mechanografie v diagnostice snížené pevnosti kostí u dětí, *DMEV*, 14(Suppl. 2): 29-30.

## 11. PŘÍLOHY

1. O. Souček, Z. Šumník, J. Lebl (2009) Kostní denzita a parametry kostní pevnosti: jejich role v hodnocení rizika fraktur u dětí, DMEV, 12(2): 85-92.
2. O. Soucek, J. Lebl, M. Snajderova, S. Kolouskova, M. Rocek, Z. Hlavka, O. Cinek, J. Rittweger, Z. Sumnik (2011) Bone geometry and volumetric bone mineral density in girls with Turner syndrome of different pubertal stages, Clin Endo, 74(4): 445-452.
3. O. Soucek, V. Komrska, Z. Hlavka, O. Cinek, M. Rocek, D. Zemkova, J. Lebl, Z. Sumnik (2012) Boys with haemophilia have low trabecular bone mineral density and sarcopenia, but normal bone strength at the radius, Haemophilia, 18(2): 222-8.