

Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu – souhrn poznatků

P. ŽIVNÝ¹, K. ŠVEJKOVSKÁ², I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ^{1,3}, V. PALIČKA¹

¹Osteocentrum, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové

²Centrum klinických studií (CCBR, a. s., Czech) v Pardubicích, ³Radioizotopové laboratoře a vivárium, LF UK v Hradci Králové

SOURHN

Živný P., Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Palička V.: **Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu**

Přehledný článek přináší souhrn současných názorů na studium biomechanických aspektů skeletální fragility v humánní a zejména v experimentální oblasti. V textu je popsána metoda testování mechanické odolnosti kosti v experimentu. Účelem testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu není simulovat nebo vysvětlit mechanismus vzniku fraktur u člověka, ale slouží výhradně pro testování změn fragility kostí pokusných zvířat za různých experimentálních podmínek.

Klíčová slova: fraktury, biomechanické vlastnosti, kost, skeletální fragilita

SUMMARY

Živný P., Švejkovská K., Gradošová I., Živná H., Palička V.: **Assessment of bone biomechanical properties in experimental research**

The review summarizes current opinions on biomechanical properties of bone and their study in humans as well as under experimental conditions. The method of experimental testing of bone biomechanical properties is described in this review. The purpose of experimental testing of bone biomechanical properties is not to explain the mechanisms of bone fractures in patients. It is intended exclusively for testing bone fragility in rats under various experimental conditions.

Keywords: fractures, biomechanical properties, bone, bone fragility

Osteologický bulletin 2011;16(4):132–136

Adresa: Doc. MUDr. Pavel Živný, Osteocentrum, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: zivny@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 27. 7. 2011

Přijato k tisku: 7. 12. 2011

Úvod

Současné možnosti hodnocení stavu mechanické odolnosti skeletu v klinických podmínkách jsou značně omezené. Na skelet působí během aktivity nepřehledné množství sil a zátěží, trvalých i nečekaných. Přes zdokonalující se zobrazovací metody, doplněné sofistikovaným softwarem je skutečná mechanická odolnost kosti stále jen odhadována, zejména na základě výsledků denzitometrických analýz (DEXA – dual energy X-ray absorptiometry s řadou doplňujících software a matematických modelů, nebo analýz založených na principech CT nebo MR – high-resolution micro-computed tomography, magnetic resonance imaging). Histologická analýza kostní tkáně má v tomto smyslu velmi omezenou výpovědní schopnost a vzorek je navíc zpravidla odebírán z míst, kde není skelet zatěžován. Schopnost kosti odolávat fraktuře (celková odolnost kosti) závisí na množství kosti (bone mass), na prostorovém uspořádání kostní hmoty (tvar a mikroarchitektura) [1,2,3] a na vlastních fyzikálních vlastnostech materiálu, ze kterého je kost tvořena [4].

Odolnost oblasti proximálního femuru u člověka

V humánních studiích jsou v oblasti proximálního femuru předmětem zájmu především „sideways falls“, tedy boč-

ní pády, které vedou k frakturám v oblasti proximálního femuru. Nedostatkem těchto studií je skutečnost, že jen 30 % dobrovolníků – zdravých mužů bylo schopno „upadnout“ přímo na bok na měkkou podložku (zíněnku), bez reflexního zmírnění pádu rukou nebo jiným svalovým úsilím, tak, aby mohly být sledovány rychlosti a síly působící na proximální femur. K takovýmto pokusům bývají užívány též kadavery nebo crash dummies [5]. Dále byla vyvinuta také řada matematických modelů a simulací [6,7].

Odolnost obratlových těl u člověka

Studium biomechanických vlastností obratlových těl *in vivo* je ještě problematictější. Jednoznačná definice vertebální fraktury zůstává kontroverzní [8] a také řada fraktur obratlových těl zůstává klinicky nerozpoznána. Obratlové fraktury však upozorňují na zvyšující se riziko dalších fraktur. Obratlové fraktury vznikají rovněž při pádech, zejména u mužů. Běžné denní aktivity vedou k významnému zatěžování páteře a zásadní otázkou je odlišit právě aktivity spojené s takovou zátěží obratlových těl, vedoucí k jejich poškození. Značnou roli zde však hrají i jiné faktory, zvedání a přenášení těžkých břemen v nevhodné poloze, např. na natažených horních končetinách nebo v předklonu. Značnou zátěží na obratlová těla je i zdánlivě nevýznamný pohyb, na-

př. zvedání ze židle bez pomoci rukou [9]. Měření biomechanické zátěže obratlových těl *in vivo* není možné, k nepřímému určení jsou však užívány kinematické analýzy, elektromyografická měření a biomechanické matematické modely [10].

Vlastnost kosti, její pevnost a elasticita souvisí tedy: A) s vlastností kostního materiálu – celkový objem kosti, stupeň mineralizace, podíl kolagenních a nekolagenních složek, podíl kortikální a trabekulární kosti; B) s geometrickými vlastnostmi – uspořádání krystalů a kolagenních vláken, tedy na uspořádání trabekulární sítě a kortikálních lamel [11].

Mechanické vlastnosti kosti zahrnují odolnost vůči tlaku, tahu a torzi, zahrnují tedy pevnost i elasticitu kosti. Pevnost kosti je dána stupněm mineralizace kosti, zatímco elasticita souvisí s organickou složkou kostní tkáně, její kvantitou a kvalitou.

Testování biomechanické odolnosti kostí *ex vivo*

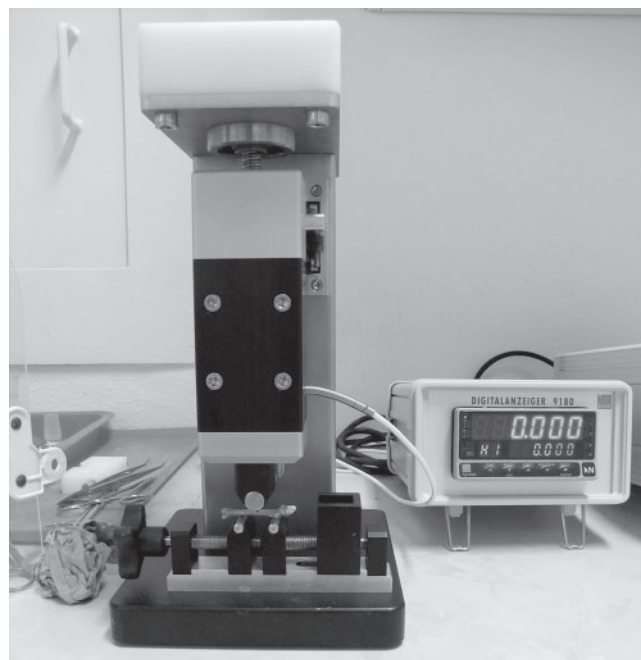
Mechanické vlastnosti kostní hmoty mohou být testovány, stejně jako se testují mechanické vlastnosti materiálů využívaných v mnoha různých odvětvích, např. stavebním, strojírenském nebo textilním průmyslu. Zde je však nutné zdůraznit, že materiály testované v průmyslu se zpravidla nevyznačují heterogenitou, kterou, jak vyplývá z textu výše, vykazuje kost (kostní tkáň). Takovéto testování materiálů je prováděno také v medicínské oblasti. Využívá se jednak při sledování vlastností vyráběných náhrad (kloubů, stentů, chlopní), ale i při sledování změn mechanických vlastností svalů, šlach a kostí.

U zvířecích modelů, kdy nejčastěji používaným experimentálním zvířetem je potkan, se testování provádí *ex vivo* na celé kosti (femur, tibie, humerus, radius), u větších zvířat pak lze použít např. také metatarzální kůstky, mandibuly nebo na části kostí. Vyhodnocení části kortikální nebo trabekulární kosti, upravené do specifických geometrických tvarů, je používáno nejen u lidských vzorků, kde jiný způsob testování není možný [12], ale i pro vzorky získané z pokusných zvířat [13].

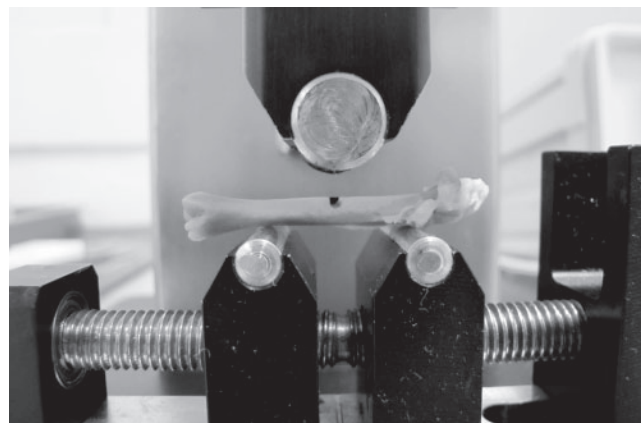
K testování mechanické odolnosti kostí jsou používány komerčně dostupné přístroje, bohužel s velmi vysokou pořizovací cenou, např. Instron, MAY 03, USA [14], Shenk-Trebel model RTP 0.6 [15], Avalon Technologies, USA [16,17], MZ500D, Maruto Co, Japonsko [18], LR5K J. Lloyd Instruments, UK [17], 145660 Z020/TND, Zwick/Roell, Německo [19]. Tyto přístroje umožňují validaci procesu testování, určení pružnosti kosti a odhad zastoupení kompaktní a spongiózní kosti. Řada autorů využívá tzv. „custom-made material testing machine“ [13,21]. Konstrukce všech těchto přístrojů vycházejí z práce Penga a spol. [22]. Tyto „na zakázku“ vyrobené přístroje nemají zpravidla software, který by umožňoval kalkulovat s parametry pružnosti, vzdorování kosti v torzi atd., ale umožňují určení síly, při které dochází k fraktuře testované kosti (jak bude popsáno níže). Těmto faktům je nutné přizpůsobit design studií tak, aby byly získány odpovědi na položené otázky. Přístroj, který jsme používali my, byl vyroben firmou Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika.

Odolnost kosti v tlaku testujeme vertikálním působením síly na kost, provádí se kompresní test krčku femuru nebo

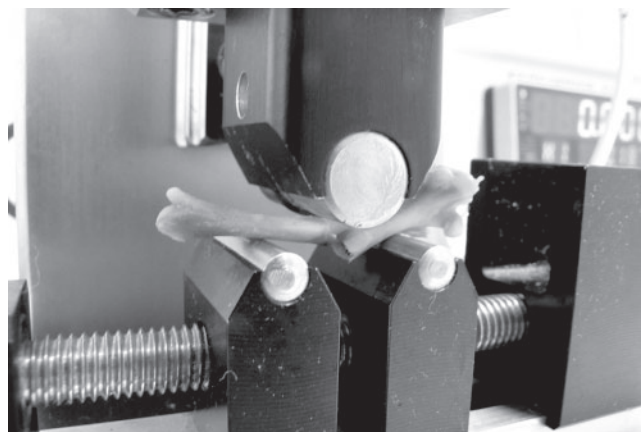
Obr. 1
Celkový pohled na přístroj na třibodové lámání,
v pravo snímací jednotka



Obr. 2
Připravený femur k třibodovému lámání



Obr. 3
Femur po zlomení třibodovým testem



obratle, dále metodou tří- až čtyřbodovým ohýbáním u dlouhých kostí, jako je femur, humerus, tibia.

Nejčastěji používaná je metoda třítbodového ohýbání kosti (three-point bending). Tuto metodu lze provádět jen na dlouhé kosti, na kterou je vyvíjen bočný tlak. Je možné testovat odolnost střední části diáfýzy femuru, ale i distální části femuru, nebo proximální části tibie [17]. Testovaná kost se umístí na dvě podpěry vzdálené od sebe na určitou vzdálenost, třetí, vrchní čepel, působí kolmo na střed lámání kosti. Přístroj zaznamenává narůstající tlakovou sílu. V momentě zlomení kosti, kdy na čidlo přestane působit tlak, se zobrazí na displeji hodnota maximální síly, která vedla ke zlomení kosti. Modernější přístroje zaznamenávají kromě maximální síly působící na kost před zlomením také tvrdost a absorpci energie v tzv. křivce zátěžového posunutí (zátěžově-deformační křivka) [11]. U našeho přístroje by bylo možné ještě zaznamenávat hodnoty narůstajícího tlaku naměřené čidlem před zlomením kosti. Tím bychom se mohli vyjádřit i k určitému stupni elasticity lámané kosti. Plánujeme tuto možnost u našeho přístroje technicky dořešit.

Čtyřbodové ohýbání se liší tím, že seshora působí místo jedné čepele dvě. Komplikací této metody ve srovnání s třítbodovým ohýbáním je podmínka, aby se obě čepele dotkly kosti ve stejný okamžik. Dalším méně používaným typem testování odolnosti kosti je použití konzoly, kdy se jeden ko-

nec kosti zafixuje pomocí pryskyřice a síla působí na volný, nepodepřený konec. Kost je orientována tak, aby napodobovala pozici kosti *in vivo*, tímto způsobem je částečně eliminována nutnost exaktního umístění a natočení kosti při tří- nebo čtyřbodovém lámání [23]. Před samotným testováním je nutné kost důkladně očistit od měkkých tkání. Odstraňování měkkých tkání je nutné provádět opatrně, aby nedošlo k poškození povrchu kosti, a tím ke zkreslení výsledků testování. Dále je potřeba zabránit vysychání kostní tkáně po dobu testování, např. zabalením do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem.

Co se týká samotného přístroje, je potřeba zajistit, aby podpěry byly hladké se zaoblenými hranami, aby se zabránilo „hromadění“ tlaku a zařezávání podpěry do kosti. Důležitost kontaktu čepelí s kostí ve stejný čas u čtyřbodového lámání byla již zmíněna, což je obtížně proveditelné vzhledem k nepravidelným tvarům kostí. Částečně se tomu můžeme vyhnout, bude-li vzdálenost mezi podpěrami co nejmenší. Dalším velkým zdrojem chyb je již zmíněný nepravidelný tvar kosti. Někteří autoři tvrdí, že vzdálenost spodních podpěr by měla být pro samice potkanů 15 mm a pro samce 20 mm, aby se zajistilo, že z 58–90 % bude deformace způsobena ohýbáním. Není-li splněna tato podmínka, zapojuje se také smyková deformace. Další možností nastavení vzdálenosti spodních podpěr je dle Leppänen a spolupracovníků [24] možné tak, aby jedna podpěra byla pod velkým trochanterem (trochanter major) a druhá pod distálním koncem femuru. Někteří autoři používali konstantní vzdálenost mezi spodními podpěrami v závislosti na velikosti kostí, které byly testovány, např. 10 mm [17] nebo 15 mm [18,25].

Další otázkou zůstává, v jakém směru kost testovat. U femuru potkana se z anatomických a především praktických důvodů dává přednost testování v předozadním směru (antero-posteriorním, AP) [21,26]. Ovšem dle jiných autorů vzhledem k funkční adaptaci kosti na zátěž, je vhodnějším směrem testování středo-boční (medio-laterální, ML). Femur má v tomto směru největší eliptický průměr diáfýzy a představuje zřejmě primární směr adaptace kosti na zatížení [24,27]. Při testování v mediolaterálním směru je ale nutné zabránit otáčení femuru na anatomicky přijatelnější anteroposteriorní stranu uchycením interkondylární části do speciálního fixačního zařízení. Již samotným uchycením kosti může dojít k ovlivnění jejích mechanických vlastností [24].

Před vlastním lámáním je testovaná kost zatížena malým stabilizujícím tlakem do 10 N, nebo např. 0,5 N [25], 1 N [20], 10 N [19]. Stabilizující tlak se aplikuje na kost zejména proto, aby se zafixovala a nedošlo k jejímu protáčení.

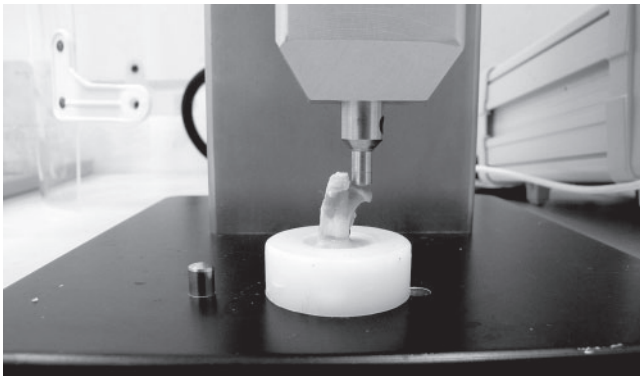
Většina testů probíhá za pokojové teploty, ale např. Iwamoto a spolupracovníci testovali třítbodové ohýbání u femurů potkanů Sprague-Dawley po třech minutách v solné lázni při teplotě 37 °C [18].

Ohýbací síla může být aplikována různou rychlostí: 50 mm/s [20], 1 mm/s [24,26], 0,5 mm/s [17], 0,155 mm/s [21], 0,1 mm/s [19], 20 mm/min [25,18], 5 mm/min [28], 2 mm/min [29].

Dalším způsobem zlomení kosti, se kterým se v klinické praxi často setkáváme, je torzní zlomení kosti, např. spirální zlomeniny bérce. V experimentu je analogií torzní test,

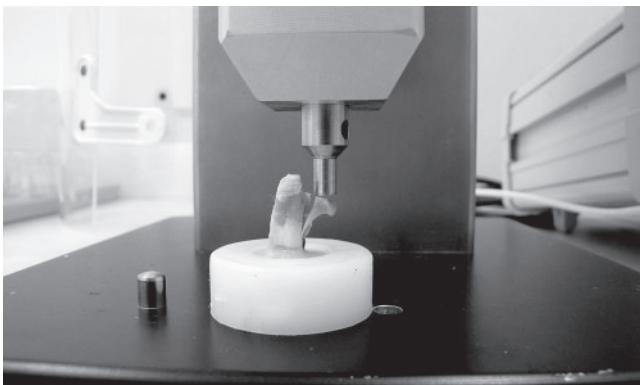
Obr. 4

Nastavení přístroje ke zlomení krčku femuru



Obr. 5

Krček femuru po jeho ulomení



kteřý dává informaci o smykovém napětí před samotným zlomením. Pro tento test se kromě celých kostí mohou také používat části kostí upravené do specifických tvarů. Test může být prováděn na všech typech kostí a v různých orientacích. Konce kostí jsou před uchycením upraveny abrazivním materiálem. Tím se zlepší přichycení polymethylmetakrylátu, do kterého jsou kosti fixovány, a teprve takto upravené konce jsou sevřeny do upevňovacího zařízení. Zabrání se tím drcení konců kostí při testování. Je třeba, aby délka kosti, která je vystavena torzi, byla vždy konstantní. Úhlová rychlost otáčení je volitelná, ale opět vždy v jednom experimentu standardní: 4,8 °/s [31], 4 °/s [14], 6 °/s [11], 10 °/min [15]. Zaznamenává se torzní síla potřebná ke zlomení kosti (Nm), přičemž některé přístroje zaznamenávají také úhel zlomení (rad; °). Další parametry, jako je mezní torzní síla, tuhost, smykový tlak a smykový modul se musejí ze základních hodnot vypočítat. Testování odolnosti kosti v torzi je metoda používaná již od 70. let 20. století [32, 33, 34].

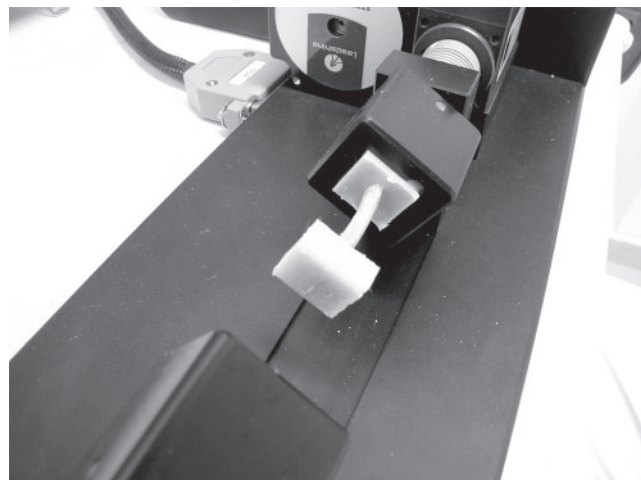
Dalším testem, poměrně hojně používaným k hodnocení mechanických vlastností kostí u potkanů, je kompresní test. Kompresi jsou nejčastěji vystavovány těla obratlů a krčky femurů. Opět lze v experimentu použít jak celé kosti, tak jen jejich části. Tato metoda je náročnější na přípravu vzorku. Kromě již výše zmíněného dokonalého očištění kosti je potřeba testovaný vzorek uchytnout ve speciálním fixačním zařízení, aby se zabránilo pohybu vzorku. K tomuto ukotvení se nejčastěji používají polyakrylamidové pryskyřice. Při testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku je potřeba celý femur, nebo jeho proximální část (získanou po tříbodovém lámání), upevnit kolmo k podložce. Hlavice femuru se opět zatíží malým stabilizačním napětím do 10 N, a poté se zahájí test, kdy síla je aplikována na kost v podélné ose. Vrchní čepel tlačí na hlavici femuru až do zlomení krčku femuru nebo do rozdrčení obratle. Rychlost stlačování je opět volitelná: 0,155 mm/s [21, 17], 1 mm/s [24, 26], 2 mm/min [29, 30], 6 mm/min [35].

Vedle kompresního testu se používá k hodnocení mechanických vlastností kostí také tahový test. Tento test je častěji používán při testování elastických materiálů, jako jsou svaly a šlachy, ale používá se např. i u dlouhých kostí. Kost se zafixuje pomocí polyakrylamidové pryskyřice na obou koncích a následně upevní horizontálně v upevňovacím zařízení. Vzdálenost mezi konci upevňovacího zařízení je volitelná, např. 3 mm. Testované kosti jsou opět vystaveny malým počátečním napětím (5–10 N). Během upevňování kosti i během samotného testování musí být kost udržována vlhká. Rychlost tahové zátěže může být 2 mm/min, nebo 1 mm/s [14]. Maximální zatížení představuje maximální tahovou sílu vyvinutou těsně před vznikem zlomeniny. Hodnoty intenzity tahu před zlomením kosti můžeme vynést do křivky. Sklon lineární části křivky zátěžového posunutí definuje tvrdost a plocha pod touto křivkou definuje energetickou absorpční kapacitu. Z křivky tlak-pevnost je možné určit mezní tlak, mezní pevnost a modul pružnosti [14].

Popisované typy ohýbání a lámání kostí bývají užívány v experimentech většinou společně (často v závislosti na množství dostupného materiálu), protože často nelze předpovědět, jakým způsobem bude pevnost kosti narušena, není

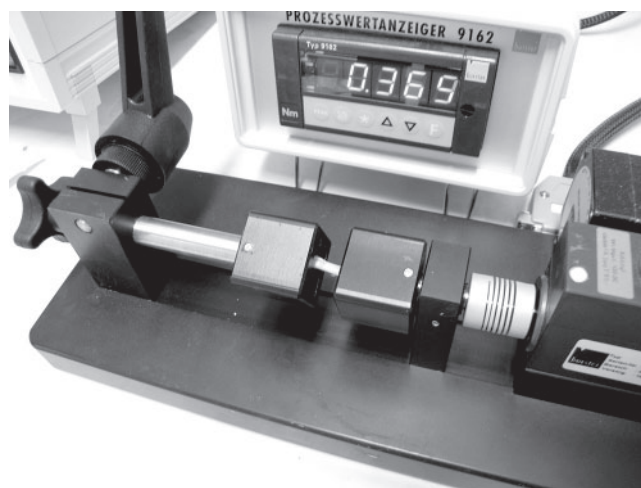
Obr. 6

Fixace femuru se zatavenými konci v polyakrylamidové hmotě v torzním přístroji



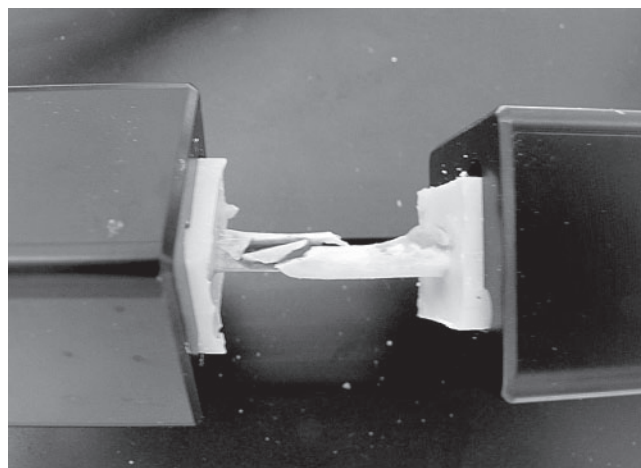
Obr. 7

Probíhající test torzního zlomení femuru se snímací jednotkou v pozadí



Obr. 8

Femur po testu zlomení torzní silou



možné říci, že některá z metod má jednoznačné výhody nebo nevýhody.

Závěr

V článku jsou shrnuty dosavadní zkušenosti experimentální skupiny v oblasti biomechanického testování kosti v experimentech na potkanech. Jde o stručný popis metod testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu metodami tříbodového nebo čtyřbodového ohýbání kosti, torzního zlomení kosti a kompresním testem. Za pomoci těchto metod lze získat představu o biomechanické odolnosti kosti a jejích změnách při působení zejména léků nebo stopových prvků, na jejichž studium je nyní experimentální skupina zaměřena.

Je zřejmé, že bude nutné vypracovat ještě další metodické postupy na testování mechanické odolnosti obratlových těl.

Ve spolupráci s tvůrci přístroje by bylo vhodné ještě zaznamenávat jednotlivé hodnoty tlaku, naměřené čidlem před definitivním zlomením kosti. Tím bychom se mohli vyjádřit i k dalším mechanickým vlastnostem kostí a postupně doplnit i o matematické zpracování výsledků, které zatím vzhledem k omezenému počtu zaznamenávaných údajů chybí.

Je nutné zdůraznit, že účelem testování biomechanické odolnosti kosti v experimentu není simulovat nebo vysvětlit mechanismus vzniku fraktur u člověka. V experimentech nejsou tedy respektovány tlaky (síly), které působí např. na obratlová těla u člověka (vertikálně), zatímco páteř, a tedy i obratlová těla u potkana, jsou horizontálně. Získané výsledky slouží výhradně pro testování změn biomechanických vlastností kostí, ovlivněných různými experimentálními podmínkami, především dlouhodobě podávanými dietami nebo léky. Do klinické praxe pak mohou být s patřičnou opatrností přenášeny pouze získané poznatky o vlivu zkoumaných látek (zejména léků) na kostní tkáň a v klinické praxi je možné se zaměřit např. na léky, které v experimentu prokázaly negativní vliv na biomechanické vlastnosti kosti.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura

- Rice JC, Covin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomechanics* 1988;21:155–168.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14:595–608.
- Hanus D, Censky T, Anderle P, Ruzicka P et al. Experimental Research of 3D Flow Fields within Curved Channels. In CTU Reports Proceedings of Workshop 2002, 11–13 February 2002 Prague; Volume B. Prague: Czech Technical University in Prague, pp 676–677. ISBN 80-01-02511-X.
- Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng* 2001;3:307–333.
- Currey JD. What determines the bending strength of compact bone? *J Exp Biol* 1999; 202: 2495–2503.
- Bouxsein M. Determinants of skeletal fragility. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:897–911.
- Bouxsein M. Biomechanics of age-related fractures. In: Marcus R, Feldman D, Nelson D, Rosen C. (eds.) *Osteoporosis*. Third Edition, San Diego, CA: Elsevier Academic Press 2007;601–616.
- van den Kroonenberg AJ, Hayes WC, McMahon TA. Hip impact velocities and body configurations for voluntary falls from standing height. *J Biomech* 1996; 29:807–811.
- Cooper C, Atkinson E, O'Fallon W, Melton L. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985–1989. *J Bone Miner Res* 1992;7:221–227.
- Adams MA, Dolan, P. Spine biomechanics. *J Biomech* 2005;38:1972–1983.
- Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol* 2007;26:380–384.
- Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 2001;19:1021–1026.
- Lepola VT, Hannuniemi R, Kippo K, Lauriäään L et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. *Bone* 1996;18:191–196.
- Comelekoglu U, Mutlu H, Yalin S, Bagis S et al. Determining the biomechanical quality of normal and osteoporotic bones in rat femora through biomechanical test and finite element analysis. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:53–57.
- Moro-Alvarez MJ, Díaz Curiel M, de la Piedra C, Mariño ML et al. Bone disease induced by phenytoin therapy: clinical and experimental study. *Eur Neurol* 2009;62:219–230.
- Lind PM, Larsson S, Johansson S, Melhus H et al. Bone tissue composition, dimensions and strength in female rats given an increased dietary level of vitamin A or exposed to 3,3 %, 4,4 %, 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) alone or in combination with vitamin C. *Toxicology* 2000;151:11–23.
- Herlin M, Kalantari F, Stern N, Sand S et al. Quantitative characterization of changes in bone geometry, mineral density and biomechanical properties in two rat strains with different Ah-receptor structures after long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology* 2010;273:1–11.
- Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y et al. Comparative therapeutic effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and mechanical properties in ovariectomized osteopenic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006;52:1–8.
- Leppänen OV, Sievänen H, Järvinen TL. Biomechanical testing in experimental bone interventions may the power be with you. *J Biomech* 2008;41:1623–1631.
- Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Schmisch S, Rack T et al. Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 2006;21:89–96.
- Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK et al. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998;23:155–161.
- Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone* 1994;15:523–532.
- McCann RM, Collearly G, Geddis C, Clarke SA et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 2008;26:384–393.
- Leppänen O, Sievänen H, Jokihaara J, Pajamäki I et al. Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *J Bone Miner Res* 2006;21:1231–1237.
- Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R et al. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone* 2006;38:136–144.
- Järvinen TL, Sievänen H, Kannus P, Järvinen M. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in predicting mechanical characteristics of rat femur. *Bone* 1998; 22:551–558.
- Leppänen OV, Sievänen H, Jokihaara J, Pajamäki I et al. The effects of loading and estrogen on rat bone growth. *J Appl Physiol* 2010;108:1737–1744.
- Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26:130–137.
- Brzóška MM, Majewska K, Moniuszko-Jakoniuk J. Mineral status and mechanical properties of lumbar spine of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Bone* 2004;34:517–526.
- Brzóška MM, Galażyn-Sidorczuk M, Rogalska J, Roszczenko A et al. Beneficial effect of zinc supplementation on biomechanical properties of femoral distal end and femoral diaphysis of male rats chronically exposed to cadmium. *Chem Biol Interact* 2008;171:312–324.
- Nazarian A, Entezari V, Vartanians V, Muller R et al. An improved method to assess torsional properties of rodent long bones. *J Biomech* 2009;42:1720–1725.
- Strömberg L, Dalén N. Experimental measurement of maximum torque capacity of long bones. *Acta Orthop Scand* 1976;47:257–263.
- Mattila P, Knuutila M, Kovanen V, Svanberg M. Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration. *Calcif Tissue Int* 1999;64: 340–344.
- Lepola VT, Väänänen HK, Jalovaara P. The effect of immobilization on the torsional strength of the rat tibia. *Clin Orthop Relat Res* 1993;297:55–61.
- Brzóška MM, Majewska K, Moniuszko-Jakoniuk J. Mechanical properties of femoral diaphysis and femoral neck of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Calcif Tissue Int* 2005;76:287–298.