



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Níveis séricos de homocisteína em crianças e adolescentes com comprometimento da saúde óssea

Petra Rehackova^a, Sylva Skalova^b, Stepan Kutilek^{c,*}

^aCenter for Clinical and Basic Research, Pardubice, Czech Republic

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hradec Králové, Charles University, Prague, Czech Republic

^cDepartment of Pediatrics, Pardubice Hospital, Faculty of Health Studies, University of Pardubice, Czech Republic

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 4 de abril de 2013

Aceito em 24 de junho de 2013

Palavras-chave:

Homocisteína

Densidade mineral óssea

Marcadores da remodelação óssea

Fraturas

RESUMO

Introdução: Foi documentada uma associação entre níveis séricos elevados de homocisteína (S-Hci) e baixa densidade mineral óssea (DMO) e aumento do risco de fratura em mulheres na pós-menopausa. São escassos os dados concernentes à S-Hci e à saúde óssea em crianças.

Objetivo: Avaliar S-Hci em crianças e adolescentes com comprometimento da saúde óssea e procurar por relações com dados clínicos e laboratoriais.

Pacientes e métodos: Avaliamos os níveis de S-Hci em 37 crianças e adolescentes (22 meninos e 15 meninas; média de idade, $13,9 \pm 3,5$ anos) com fraturas prevalentes por trauma de baixa energia (média $3,3 \pm 2,3$ por paciente) e/ou baixa DMO espinhal/L1-L4 (score Z abaixo de -2 DP; DXA Lunar GE). Também avaliamos S-ALP, CrossLaps sérico (S-Hci-CrossLaps), osteocalcina (S-OC), altura, peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e níveis séricos de folato e vitamina B12. Por ocasião da avaliação, as crianças não estavam tomando qualquer medicação que sabidamente influenciasse o metabolismo ósseo. Os parâmetros dependentes de idade foram expressos como escores Z \pm DP.

Resultados: O escore Z para S-Hci foi significativamente mais alto ($1,3 \pm 1,5$; $P < 0,0001$) e o escore Z de para DMO/L1-L4 foi significativamente mais baixo ($-1,7 \pm 1,3$; $P < 0,0001$), respectivamente, em comparação com os valores de referência. S-ALP não diferiu dos valores de referência ($P = 0,88$), enquanto S-CrossLaps e S-osteocalcina foram mais elevados ($1,2 \pm 1,8$ e $0,4 \pm 0,5$; $P = 0,0001$ e $P = 0,001$, respectivamente). S-Hci estava inversamente correlacionada com DMO/L1-L4 ($r = -0,33$; $P = 0,05$) e S-ALP ($r = -0,36$; $P = 0,04$) não tendo relação com o número de fraturas prevalentes ($r = 0,01$), S-osteocalcina ($r = -0,22$) ou S-CrossLaps ($r = 0,003$).

Conclusão: Esses resultados sugerem aumento na remodelação óssea e uma influência negativa da S-Hci elevada na formação óssea e na DMO em crianças e adolescentes com fraturas recorrentes.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: stepan.kutilek@nemocnice-pardubice.cz (S. Kutilek).

Serum homocysteine levels in children and adolescents with impaired bone health

ABSTRACT

Keywords:

Homocysteine
Bone mineral density
Bone turnover markers
Fractures

Introduction: Association between high serum homocysteine (S-Hcy) levels and low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk in postmenopausal women has been documented. Data concerning S-Hcy and bone health in children are scarce.

Objective: Our aim was to evaluate S-Hcy in children and adolescents with impaired bone health and look for correlations with clinical and laboratory data.

Patients and methods: We assessed S-Hcy levels in 37 children and adolescents (22 boys and 15 girls; mean age 13.9 ± 3.5 years) with prevalent low-energy trauma fractures (mean 3.3 ± 2.3 per patient) and/or low spinal L1-L4 BMD (below $-2SD$ Z-score; DXA Lunar GE). We also evaluated S-ALP, serum CrossLaps, osteocalcin (S-OC), body height, weight, body mass index (BMI) and serum levels of folate and vitamin B12. At the time of assessment, the children were not taking any drugs known to influence bone metabolism. The age-dependent parameters were expressed as Z-scores \pm SD.

Results: S-Hcy Z-score was significantly higher (1.3 ± 1.5 ; $P < 0.0001$) and L1-L4 BMD Z-score was significantly lower (-1.7 ± 1.3 ; $P < 0.0001$), respectively, in comparison with reference values. S-ALP did not differ from reference values ($P = 0.88$), while S-CrossLaps and S-osteocalcin were higher (1.2 ± 1.8 and 0.4 ± 0.5 ; $P = 0.0001$ and $P = 0.001$, respectively). S-Hcy was inversely correlated to L1-L4 BMD ($r = -0.33$; $P = 0.05$) and S-ALP ($r = -0.36$; $P = 0.04$) and not related to number of prevalent fractures ($r = 0.01$), S-osteocalcin ($r = -0.22$) or S-CrossLaps ($r = 0.003$).

Conclusion: These results suggest increased bone turnover and negative influence of elevated S-Hcy on bone formation and BMD in children and adolescents with recurrent fractures.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Homocisteína é um aminoácido biossintetizado a partir da metionina, que se dá mediante a remoção de seu grupo metila terminal da cadeia carbônica. Além disso, homocisteína pode ser reciclada até metionina ou convertida em cisteína. O metabolismo da homocisteína depende do quadro das vitaminas B6, B9 e B12 e também da concentração sérica de folato.^{1,2} Níveis séricos elevados de homocisteína (S-Hci) estão associados a alterações na morfologia vascular, perda da função antitrombótica endotelial e indução de um ambiente pró-coagulante, tendo sido ainda ligados a doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes, trombose e fenômeno de Raynaud.²⁻⁴

Associações entre níveis elevados de S-Hci e baixa densidade mineral óssea (DMO) e maior risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa têm sido repetidamente documentadas.⁵⁻¹³ Até o momento, são escassos os dados concernentes à S-Hci e saúde óssea em crianças e adolescentes. Em nosso estudo-piloto recentemente publicado, envolvendo 19 crianças (12 meninos e 7 meninas; média de idade $14,9 \pm 3,3$ anos) com fraturas recorrentes e baixa DMO, observamos S-Hci elevada (tabela 1), com correlações inversas elevadas e significativas entre S-Hci e DMO ($r = -0,66$; $p = 0,01$) e S-Hci e atividade da fosfatase alcalina sérica (S-ALP) ($r = -0,56$; $P = 0,03$), respectivamente.¹⁴ Não houve relação entre S-Hci e número de fraturas prevalentes ($r = 0,11$) ou S-CrossLaps ($r = -0,14$).¹⁴

Diante disso, analisamos mais aprofundadamente os níveis de S-Hci, juntamente com índices de remodelação óssea e diversos parâmetros clínicos e bioquímicos em um grupo de 37 crianças e adolescentes com baixa DMO e/ou fraturas prevalentes por trauma de baixa energia.

Pacientes e métodos

Pacientes

Avaliamos os prontuários clínicos de crianças e adolescentes que compareceram à nossa Clínica Pediátrica Óssea, no Departamento de Pediatria, em Pardubice, entre 2006-2012. Os critérios de inclusão foram: (i) idade entre cinco e 20 anos; (ii)

Tabela 1 – Dados de pacientes obtidos de um estudo-piloto precedente (n = 19),¹⁴ expressos como escores Z \pm DP

| Parâmetro | Média | DP | p ^a |
|----------------|-------|-----|----------------|
| S-homocisteína | 1,4 | 1,8 | 0,001 |
| DMO/L1-L4 | -2,1 | 1,3 | 0,0001 |
| S-ALP | 0,03 | 1,0 | 0,91 |
| S-CrossLaps | 1,5 | 1,9 | 0,001 |
| Altura | -0,06 | 1,0 | 0,27 |

DMO, densidade mineral óssea; S-ALP, atividade da fosfatase alcalina sérica.

^aComparado com dados de referência.

história pessoal de pelo menos duas fraturas prevalentes por trauma de baixa energia; ou (iii) baixa DMO espinhal/L1-L4 (escore Z abaixo de -2 DP); ou (iv) uma combinação de ambos.

Foram incluídas quatro crianças com menos de duas fraturas prevalentes e baixas DMO. Nelas, determinamos DMO pelas seguintes razões: em um menino sem fratura prevalente, a determinação da DMO foi realizada em vistas da presença de fatores de risco para fragilidade óssea (imobilização permanente, seguida de uma hemorragia intracraniana); em duas meninas com fraturas, medimos DMO devido à estimativa da baixa densidade óssea nas radiografias dos membros, obtidas por um cirurgião em seguida a lesões a tecidos moles; e em uma menina, em decorrência de uma fratura femoral causada por trauma de baixa energia.

Consideramos como não qualificados para avaliação os pacientes que estivessem tomando qualquer medicação que, sabidamente, influenciasse o metabolismo ósseo (alfacalcidol, calcitriol, diidrotaquisterol, bifosfonatos, glicocorticosteroides, esteroides anabólicos, antiepilépticos, tiazidas, furosemida, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento, heparina, varfarina) por ocasião da avaliação ou em qualquer momento anterior. Também foram excluídos pacientes com diabetes mellitus, doença celíaca, doença intestinal inflamatória, transtornos autoimunes, síndrome de Cushing, insuficiência renal crônica, hiperparatiroidismo, hipotireoidismo, hiper e hipoparatiroidismo.

Todos os participantes estavam em uma dieta comum para a Europa central, consistindo principalmente de carne e carboidratos. Nenhum deles tinha dieta pobre em vitamina B e nem estava sendo medicado com doses dessa vitamina excedendo as ingestões diárias recomendadas. Um menino obeso foi tratado para hipertensão com enalapril. As demais crianças eram normotensas. Assim, incluímos 37 crianças e adolescentes (22 meninos e 15 meninas; faixa etária 7-20 anos; média de idade $13,9 \pm 3,5$ anos).

Procedimentos

Avaliamos os seguintes dados em todos os 37 pacientes: S-Hci, marcadores de formação óssea: S-ALP e osteocalcina sérica (S-OC), marcador de reabsorção óssea CrossLaps sérico, cálcio sérico (S-Ca), fosfato sérico (S-P), níveis séricos de folato e vitamina B12, altura, peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e DMO espinhal/L1-L4. Também avaliamos S-colesterol. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados com base em uma amostra de sangue matinal com os pacientes em jejum.

Materiais e métodos

A altura foi medida no dia da coleta de sangue, relevante até $\pm 0,5$ cm, em um estadiômetro calibrado.

O peso corporal foi medido no mesmo dia, em uma balança calibrada até $\pm 0,5$ kg.

IMC foi calculado utilizando a equação $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2$ (m).

DMO foi mensurada na coluna vertebral (L1-L4) com absorciometria por raios X de dupla energia (DXA) Lunar GE, no dia

da coleta de sangue. A precisão das mensurações, expressa em coeficiente de variação, foi 1%.

O nível sérico de homocisteína foi avaliado por quimioluminescência (sistema de imunoteste Immulite 2500, Siemens Healthcare Diagnostics, Alemanha) e expresso em $\mu\text{mol/L}$. A variação intertestes foi de 2,06% em amostras com concentração de S-Hci = $7,43 \mu\text{mol/L}$; 1,99% com S-Hci = $10,31 \mu\text{mol/L}$, e 1,72% com S-Hci = $22,25 \mu\text{mol/L}$, respectivamente. S-Ca e S-P foram avaliados por análise colorimétrica e expressos em mmol/L . S-ALP foi medido por análise colorimétrica e expresso em $\mu\text{kat/L}$.

CrossLaps sérico e S-OC foram avaliados por imunoteste de eletroquimioluminescência – ECLIA em analisadores Elecsys-Cobas e expressos em ng/L e ng/mL , respectivamente.

As concentrações séricas de ácido fólico e vitamina B12 (S-B12) foram avaliadas por quimioluminescência em um analisador Access (Beckman Coulter) e expressas em $\mu\text{g/L}$ e ng/L , respectivamente.

Análise estatística

Para que fosse eliminada a influência da idade, os resultados obtidos para peso corporal, altura, IMC, S-Hci, S-ALP, S-CrossLaps e S-OC foram calculados como escores de desvio-padrão (EDP) ou como escores Z pela equação $EDP = (\text{valor individual real} - \text{valor médio para idade e gênero}) / \text{desvio-padrão}$ para idade e gênero. Os dados de referência para DMO (relativos à população pediátrica europeia) foram fornecidos pelo fabricante juntamente com o pacote de softwares de DXA. Resultados previamente publicados serviram como dados de referência: parâmetros antropométricos tchecos de uma pesquisa de 2001,¹⁵ valores para Hci previamente obtidos de uma população pediátrica tcheca saudável,¹⁶ valores para S-ALP de crianças tchecas¹⁷ e níveis de S-CTx de uma população inglesa saudável.¹⁸ A faixa normal para S-OC foi determinada em 77 crianças com idades entre 7-19 anos e sem evidência de transtorno ósseo, hepático, renal, gastrointestinal ou endócrino. Para a análise estatística, foram utilizados Sigmaplot 2.0 e o programa Systat. A análise estatística foi realizada por teste-t não pareado. Foi feita uma análise de regressão linear para comparar a relação entre os respectivos parâmetros. Para todos os resultados, ficou estabelecido $p < 0,05$ para significado estatístico.

Resultados

O número médio de fraturas prevalentes causadas por trauma de baixa energia foi $3,3 \pm 2,3$ (DP) por paciente. O nível médio de S-homocisteína foi $10,7 \mu\text{mol/L} \pm 2,9$ DP; variação, $6,7-20 \mu\text{mol/L}$. Foi observada uma correlação positiva significativa com idade ($r = 0,47$, $p < 0,01$) (fig. 1).

Sete pacientes (19%) tiveram nível de S-homocisteína acima de +2DP, e 30 (81%) tiveram níveis de S-homocisteína na faixa de ± 2 DP.

Quando convertido a escores Z e comparado com os valores de referência, o escore Z para S-Hci foi significativamente mais elevado, e o escore Z para DMO/L1-L4 foi significativamente mais baixo, respectivamente, em comparação com os valores de referência. O escore Z para S-ALP não diferiu dos

valores de referência, enquanto que S-CrossLaps foi mais elevado; o mesmo para S-OC (tabela 2).

Os níveis médios de S-folato e B12 foram $7,5 \mu\text{g/L} \pm 4,2 \text{ DP}$ e $413 \text{ ng/L} \pm 143 \text{ DP}$, que se enquadram dentro das faixas de referência normais de $2,3\text{-}17 \mu\text{g/L}$ e $180\text{-}914 \text{ ng/L}$, respectivamente.

Os níveis de S-Ca e S-P ficaram dentro da faixa de referência normal (média \pm DP: $2,33 \pm 0,10 \text{ mmol/L}$; variação, $2,13\text{-}2,54$; e $1,45 \pm 0,23 \text{ mmol/L}$; variação, $0,78\text{-}1,99$, respectivamente). O nível médio de S-colesterol foi $4,21 \pm 0,96 \text{ mmol/L}$ (variação; $3,06\text{-}5,59 \text{ mmol/L}$); portanto, dentro da faixa de referência normal de $2,7\text{-}5,6 \text{ mmol/L}$.

As médias para altura, peso corporal e escore Z para IMC não diferiram dos valores de referência (tabela 2), mas em cinco participantes o escore Z para IMC excedeu $+2 \text{ DP}$. A altura, o peso corporal e os escores Z para IMC tiveram correlações positivas com o escore Z para DMO/L1-L4 ($r = 0,44$; $0,53$ e $0,50$; respectivamente; $p = 0,02$).

S-Hci teve correlação inversa com DMO/L1-L4 (fig. 2) e S-ALP (fig. 3), respectivamente, e não teve relação com o número de fraturas prevalentes ($r = 0,11$), S-osteocalcina ($r = -0,22$) ou S-CrossLaps ($r = 0,003$).

S-homocisteína

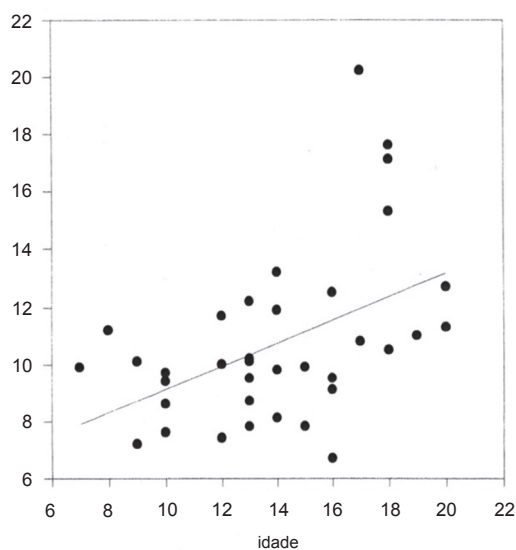


Figura 1 – S-homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) vs idade (anos). $R = 0,47$, $p < 0,01$.

Tabela 2 – Dados de pacientes do presente estudo ($n = 37$) expressos como escores Z \pm DP

| Parâmetro | Média | DP | p^a |
|----------------|-------|------|------------|
| S-homocisteína | 1,31 | 1,49 | $< 0,0001$ |
| DMO/L1-L4 | -1,74 | 1,32 | $< 0,0001$ |
| S-ALP | 0,02 | 1,01 | 0,88 |
| S-CrossLaps | 1,21 | 1,79 | 0,0001 |
| S-osteocalcina | 0,38 | 0,53 | 0,001 |
| Altura | -0,05 | 1,31 | 0,82 |
| Peso | 0,18 | 1,62 | 0,50 |
| IMC | 0,48 | 1,88 | 0,12 |

DMO, densidade mineral óssea; S-ALP, atividade da fosfatase sérica alcalina; IMC, índice de massa corporal.

^aComparado com dados de referência.

Foi observada uma correlação inversa significativa entre S-Hci e vitamina B12 ($r = -0,36$; $p = 0,05$) e não houve correlação entre S-Hci e o nível sérico de ácido fólico ($r = 0,05$).

Além disso, observamos correlações positivas entre S-osteocalcina e S-CTx ($r = 0,36$; $p = 0,05$), S-ALP e S-OC ($r = 0,58$; $p = 0,01$), e S-CTx e S-ALP ($r = 0,39$; $p = 0,05$), respectivamente.

Discussão

Em nosso estudo-piloto precedente de 19 crianças com fraturas prevalentes e baixa DMO, os resultados obtidos sugeriram uma influência negativa da S-Hci elevada na formação óssea e na DMO, enquanto a reabsorção óssea se encontrava

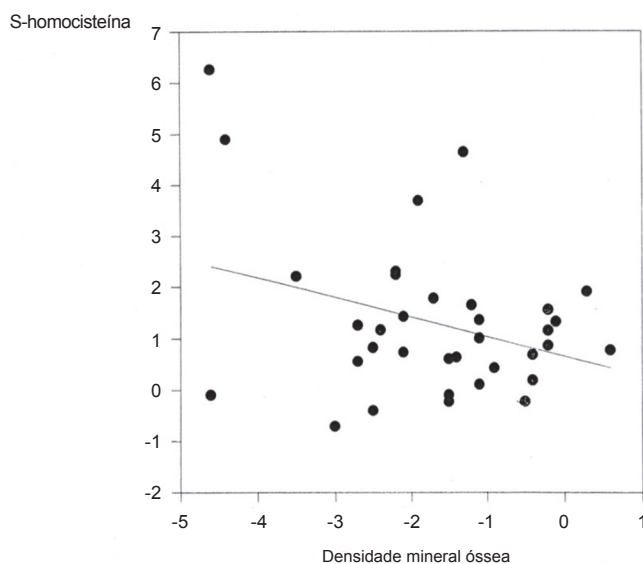


Figura 2 – S-homocisteína (escore Z) vs densidade mineral óssea (escore Z). $R = -0,33$, $p = 0,05$.

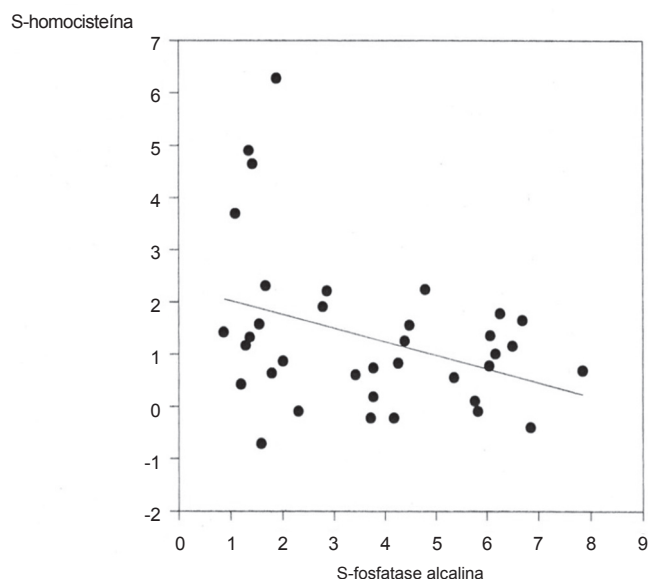


Figura 3 – S-homocisteína (escore Z) vs atividade da S-fosfatase alcalina (escore Z). $R = -0,36$, $p = 0,04$.

aumentada nesse grupo de pacientes pediátricos.¹⁴ Em um grupo expandido de 37 crianças com comprometimento do estado ósseo, obtivemos resultados muito similares. A S-Hci estava elevada e tinha correlação inversa com S-ALP e DMO. Ademais, encontramos em nossos pacientes índices de aumento na remodelação óssea, pois S-OC e S-CrossLaps estavam elevados em comparação com os dados de referência, e observamos correlações mútuas positivas entre os marcadores de remodelação óssea. A baixa DMO em nossos pacientes não foi influenciada por crescimento retardado, pois a altura não diferiu do valor de referência; mas nossos resultados confirmam a dependência da DMO nos parâmetros antropométricos básicos. Visto existir uma comprovada associação entre baixa densidade óssea e fraturas em crianças,^{19,20} a hiper-homocisteinemia poderia representar um fator de risco importante para a saúde óssea das crianças. Além disso, em adultos, vários autores informaram uma associação entre S-Hci elevada e baixa DMO,^{6,11} assim como uma elevada S-Hci em mulheres na pós-menopausa e com osteoporose sem relação com os valores de DMO.⁷ Ademais, outra pesquisa revelou que níveis elevados de homocisteína estão associados a maior risco de fratura do quadril na população idosa.¹⁰

Do ponto de vista fisiopatológico, atualmente, a osteoporose e o risco mais alto de fratura em pacientes com S-Hci elevada são explicados pelo acúmulo de homocisteína nos ossos, resultando em nítida redução do osso esponjoso e em queda na resistência óssea.⁹ Além disso, a homocisteína estimula a atividade osteoclástica.²¹ Uma capacidade reduzida de metilação das células ósseas também poderia ser fator contributivo.²²

Visto não termos observado qualquer relação entre o número de fraturas prevalentes e S-Hci em nosso grupo de pacientes, é possível propor a hipótese de que o estudo não tinha potência suficiente para detectar uma relação significativa entre esses dois parâmetros. Com relação aos fatores de risco cardiovasculares, não observamos elevações significativas de S-colesterol e IMC em nossos pacientes, e apenas um dos participantes era hipertenso.

De qualquer modo, nossos resultados confirmam mais incisivamente o efeito negativo de níveis elevados de S-Hci na saúde óssea, mesmo na população pediátrica. Os aspectos evolutivos dos vários estados patológicos dos idosos (como osteoporose, pressão arterial elevada, hipercolesterolemia e obesidade) vêm recebendo especial atenção, pois esses transtornos geralmente têm sua origem na infância. Parece provável que esse também seja o caso do efeito da homocisteína na qualidade óssea.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que níveis elevados de S-Hci podem constituir um fator de risco para comprometimento da saúde óssea em crianças e adolescentes.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Rauh M, Verwied S, Knerr I, Dörr HG, Sönnichsen A, Koletzko B. Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. *Amino Acids*. 2001;20:409-18.
2. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al.; DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): Consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1392-403.
3. Riddell LJ, Chisholm A, Duncan A, Mann JI. Homocysteine levels in healthy New Zealanders and those with vascular disease. *N Z Med J*. 1999;112:438-42.
4. Kutilek S, Nemeč V, Bockayová E. Elevated serum homocysteine levels in paediatric patients with primary Raynaud's phenomenon. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52:125-30.
5. Bozkurt N, Erdem M, Yilmaz E, Erdem A, Biri A, Kubatova A, et al. The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280:381-7.
6. Bucciarelli P, Martini G, Martinelli I, Ceccarelli E, Gennari L, Bader R, et al. The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in post-menopausal women. *Eur J Intern Med*. 2010;21:301-5.
7. Haliloglu B, Aksungar FB, Ilter E, Peker H, Akin FT, Mutlu N, et al. Relationship between bone mineral density, bone turnover markers and homocysteine, folate and vitamin B12 levels in postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281:663-8.
8. Krivosíková Z, Krajčovicová-Kudláčková M, Spustová V, Stefková K, Valachovicová M, Blazíček P, et al. The association between high plasma homocysteine levels and lower bone mineral density in Slovak women: the impact of vegetarian diet. *Eur J Nutr*. 2010;49:147-53.
9. Lévassour R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine*. 2009;76:234-40.
10. Leboff MS, Narweker R, LaCroix A, Wu L, Jackson R, Lee J, et al. Homocysteine levels and risk of hip fracture in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1207-13.
11. Ouzzif Z, Oumghar K, Sbai K, Mounach A, Derouiche EM, El Maghraoui A. Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal women. *Rheumatol Int*. 2010;32:123-8.
12. Shiraki M, Kuroda T, Shiraki Y, Tanaka S, Higuchi T, Saito M. Urinary pentosidine and plasma homocysteine levels at baseline predict future fractures in osteoporosis patients under bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab*. 2011;29:62-70.
13. Yilmaz N, Eren E. Homocysteine oxidative stress and relation to bone mineral density in post-menopausal osteoporosis. *Aging Clin Exp Res*. 2009;21:353-7.
14. Kutilek S, Rehackova P, Nemeč V, Bockayová E. Serum homocysteine levels in children with fractures and low bone mineral density – a pilot study. *Osteol Bull*. 2012;17:65-8.
15. Kobzova J, Vignerova J, Blaha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Publ Health*. 2004;12:126-30.
16. Nemeč V, Bockayová E, Kutilek Š. Serum homocysteine levels in Czech children and adolescents. *Acta Medica*. 2012;55:87-90.
17. Kutilek S, Bayer M. Total serum alkaline phosphatase activity and its relationship to age and growth in children. *Osteol Bull*. 2003;8:52-5.

18. Crofton PM, Evans N, Taylor MRH, Holland CV. Serum CrossLaps: Pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem*. 2002;48:671-3.
19. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, Tobias JH. Association between bone mass and fractures in children: A prospective cohort study. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1489-95.
20. Clark EM, Tobias JH, Ness AR. Association between bone density and fractures in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*. 2006;117:291-7.
21. Vaes BL, Lute C, Blom HJ, Bravenboer N, de Vries TJ, Everts V, et al. Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid. *Calcif Tissue Int*. 2009;84:413-22.
22. Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, et al. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone*. 2009;44:467-75.