

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



## **Vliv výživy na metabolismus kostí**

**Klára Švejkovská**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Klinická biochemie**

**Hradec Králové**

**2015**

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

Autor: Mgr. Klára Švejkovská  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF UK a FN v Hradci Králové

Školitel: doc. MUDr. Helena Živná, CSc.  
Radioizotopové laboratoře a Vivárium  
Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Univerzita Karlova v Praze

Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF UK a FN v Hradci Králové

Oponenti: doc. MUDr. Štěpán Kutílek, CSc.  
Dětské oddělení  
Klatovská nemocnice a.s.

prof. MUDr. Pavel Horák, CSc.  
III. interní klinika - nefrologická, revmatologická a  
endokrinologická  
Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Klinické biochemie 3. září 2015 na UKBD ve 4. patře v prostorách posluchárny od 13:00 hodin.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

MZO 00179906  
MSM 0021620820  
SVV-2010-62051  
SVV-2011-262902  
SVV-2012-264902  
SVV-2013-266902  
PRVOUK 37/11  
PRVOUK 37/05

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

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

## Obsah

1.	Souhrn .....	3
2.	Summary .....	4
3.	Úvod do problematiky .....	5
3.1	Vyšetřovací metody .....	5
3.1.1	Zobrazovací metody .....	5
3.1.2	Biomechanické testování .....	5
3.1.3	Biochemické metody .....	6
3.2	Aminokyseliny .....	7
3.2.1	Glutamin .....	7
3.2.2	Arginin .....	7
3.2.3	Kreatin .....	7
3.2.4	Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem .....	7
3.2.5	Kasein .....	7
3.3	Nedostatek nebo nadbytek proteinů v potravě .....	7
3.4	Hladovění .....	8
3.5	Železo .....	8
4.	Cíle disertační práce .....	8
5.	Experimentální část .....	9
5.1	Experiment s podáváním aminokyselin a bílkoviny .....	9
5.1.1	Experimentální dieta .....	9
5.1.2	Experimentální zvířata .....	9
5.1.3	Experiment s dietou obohacenou o aminokyseliny a bílkovinu .....	9
5.1.4	Experiment s dietou obohacenou o arginin .....	9
5.1.5	Experiment s dietou obohacenou o kreatin .....	9
5.1.6	Experiment s dlouhodobým omezením příjmu potravy – párové krmení .....	10
5.1.7	Experiment s krátkodobým hladověním .....	10
5.2	Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve .....	10
5.2.1	Experimentální dieta .....	10
5.2.2	Experimentální zvířata .....	10
5.3	Materiál a metody .....	11
5.3.1	Příprava vzorků .....	11
5.3.2	Homogenizace .....	11
5.3.3	Biochemická analýza .....	11
5.3.3.1	Experiment s podáváním aminokyselin a bílkovin .....	11
5.3.3.2	Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve .....	11
5.3.4	Denzitometrické vyšetření .....	11
5.3.5	Testování mechanické odolnosti kostní tkáně .....	11
5.3.6	Statistická analýza a zpracování dat .....	12
6.	Výsledky .....	12
6.1	Validace přesnosti přístroje .....	12
6.2	Vliv diety obohacené o glutamin .....	12
6.3	Vliv diety obohacené o arginin .....	12
6.4	Vliv diety obohacené o kreatin .....	13
6.5	Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny .....	13
6.6	Vliv diety obohacené o kasein .....	13
6.7	Vliv realimentace SLD .....	13
6.7.1	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein .....	13
6.7.2	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny .....	13
6.7.3	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin .....	13
6.8	Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – párové krmení .....	13
6.8.1	Párové krmení standardní laboratorní dietou .....	13
6.8.2	Párové krmení dietou obohacenou o kasein .....	14

6.9	Vliv krátkodobého hladovění .....	14
6.9.1	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety.....	14
6.9.2	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin .....	14
6.9.3	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin.....	14
6.10	Vliv železa a opakovaných odběrů krve.....	14
6.10.1	Vliv nadbytku železa v dietě .....	14
6.10.2	Vliv opakovaných odběrů krve u jednotlivých typů diet .....	14
7.	Diskuse.....	15
7.1	Vliv diety obohacené o glutamin na metabolismus kostí.....	15
7.2	Vliv diety obohacené o arginin na metabolismus kostí.....	15
7.3	Vliv diety obohacené o kreatin na metabolismus kostí .....	15
7.4	Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny na metabolismus kostí .....	16
7.5	Vliv diety obohacené o kasein na metabolismus kostí.....	16
7.6	Vliv realimentace SLD na metabolismus kostí .....	17
7.6.1	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein .....	17
7.6.2	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny .....	18
7.6.3	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin ...	18
7.7	Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy - vliv párového krmení na metabolismus kostí .....	18
7.8	Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostí.....	18
7.8.1	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety.....	18
7.8.2	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin .....	19
7.8.3	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin.....	19
7.9	Vliv železa a opakovaných odběrů krve na metabolismus kostí .....	19
7.9.1	Vliv nadbytku železa v dietě .....	19
7.9.2	Vliv nadbytku železa v dietě a opakovaných odběrů krve .....	20
8.	Závěry.....	21
9.	Použitá literatura .....	23
10.	Přehled přednáškové a publikační činnosti .....	28
10.1	Původní vědecké práce s impakt faktorem.....	28
10.2	Ostatní publikace v časopise s IF .....	28
10.3	Původní publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech.....	28
10.4	Monografie .....	29
10.5	Ostatní publikace v časopise bez IF .....	29
10.6	Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních.....	29

## 1. Souhrn

### Vliv výživy na metabolismus kostí

Kosti mají nejen opěrnou a ochrannou funkci, ale účastní se na krvetvorbě i hospodaření s minerály. Neustálá remodelace kostí je citlivý proces, který je významně ovlivňován i výživou.

V předkládané práci byl sledován vliv vybraných bílkovin, aminokyselin, železa a vybraných stavů; dlouhodobé omezení množství potravy, krátkodobé hladovění a opakované odběry krve, na parametry kostí, jako je délka a průměr kosti, šířka kortikální kosti a mechanické vlastnosti – odolnost k ohybu, tlaku a torzi. Hodnotili jsme také změny koncentrací vybraných kostních markerů, změny v hustotě kostního minerálu a změny svalové a tukové tkáně u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar.

Během doktorského studia jsem se věnovala experimentům sledujícím vliv výše uvedených látek na kost. V 1. experimentu byly samcům potkanů podávány vybrané bílkoviny a aminokyseliny: glutamin (GLN), větvené aminokyseliny - valin, leucin a izoleucin (BCAA), a kasein (KAS) *ad libitum*. Dále byl sledován vliv týdenní realimentace standardní laboratorní dietou (SLD) po dlouhodobém podávání diet obohacených o uvedené aminokyseliny a bílkoviny. Kontrolní skupina byla skupina krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*. Ve 2. experimentu byl sledován vliv párového krmení skupiny krmené standardní laboratorní dietou a kaseinem vůči skupině krmené BCAA (dlouhodobé omezení příjmu potravy). Ve 3. experimentu byl sledován vliv diety obohacené o arginin (Arg) a kreatin (Krea) podávané *ad libitum*, nebo po jejich odnětí na 24 hodin (krátkodobé hladovění). Ve 4. experimentu byl sledován vliv dvou různých koncentrací železa v dietě, stav organismu byl modifikovaný i opakovanými odběry krve.

Změny v kostní hmotě nevyvolala dieta obohacená o glutamin ani o kasein. Kostní hmotu ovlivnila dieta s větvenými aminokyselinami: nižší tělesná hmotnost, femury byly kratší, méně odolné v ohybu, byl nižší kostní obrat i kostní minerální hustota v oblasti ocasních obratlů. Domníváme se, že zhoršení kostního metabolismu bylo způsobeno jak složením diety, tak i nižším příjmem potravy. Realimentace standardní laboratorní dietou vedla u skupiny krmené KAS k navýšení kostního obratu, u skupiny suplementované BCAA k aktivaci osteoblastů a u skupiny krmené GLN k poklesu kostní minerální hustoty femuru. Domníváme se, že vliv návratu k SLD by se plně projevil až při dlouhodobějším trvání realimentace.

Sledovali jsme vliv párového krmení u skupiny se SLD a s dietou KAS, abychom potvrdili výše uvedenou hypotézu. U obou párově krmených skupin došlo ke zhoršení stavu kostní hmoty ve srovnání se skupinami krmenými *ad libitum*. Ovšem v porovnání se skupinou krmenou BCAA byl stav kostní hmoty obou skupin lepší. Lze konstatovat, že změny v kostní hmotě souvisí s kvantitativním i kvalitativním složením potravy.

Dále jsme zjistili, že vliv suplementace argininem a kreatinem na kostní tkáň byl spíše negativní, i když významně jen u ohybu tibie skupiny krmené argininem. Hladovění mělo negativní vliv na kostní tkáň, došlo k poklesu odolnosti tibie v torzi u skupiny SLD. U skupiny krmené argininem krátkodobé hladovění nezhoršilo mechanické vlastnosti kostí, u skupiny krmené kreatinem dokonce došlo k podpoře kostní novotvorby.

Železo podávané v nadbytku ani opakované odběry krve nevedly k ovlivnění metabolismu kostní hmoty, ani mechanických vlastností u zdravých dospělých potkanů kmene Wistar, pravděpodobně z důvodu velmi dobré kompenzace tohoto stavu zdravým organismem a příliš krátkou dobou trvání experimentu.

Uvedenými závěry jsme tedy neprokázali, že suplementace vybranými bílkovinami, aminokyselinami, železem či jejich kombinace s dlouhodobým omezením množství potravy, krátkodobým hladověním nebo opakovanými odběry krve, vedou k závažným změnám kostní hmoty u zdravých samců potkanů kmene Wistar.

Rozpoznání mechanismů, kterými se zdravý organismus dokáže vypořádat se změněnými podmínkami, by mohlo být předmětem dalšího výzkumu. Otázkou také zůstává, jak by na tyto podmínky reagovaly samice potkanů, jedinci s kostním či jiným onemocněním anebo jedinci vyššího věku.

## 2. Summary

### The effect of nutrition on bone metabolism

The bone has a function for support and protection, and is also a place for hematopoiesis and for mineral homeostasis.

The subject of interest of this thesis is to evaluate the effect of chosen proteins, amino acids, iron and the conditions such as long-term under-nutrition, short-term starving and repeated blood withdrawals on the bone parameters – the length and the diameter of the bone, the width of corticalis, and the mechanical properties – resistance to bending, tension and torsion. There were evaluated changes in the concentration of bones markers, changes in the bone mineral density and changes in lean mass and adipose mass in healthy adult males of the Wistar rats .

During my doctorate studies I was studying the effect of these components on the bones. In the 1<sup>st</sup> experiment the rats were fed by the chosen proteins and amino acids: glutamine (GLN), branched-chain amino acids- valine, leucine and isoleucine (BCAA), and caseine (KAS) *ad libitum*. Further we monitored the effect of one-week realimentation by standard laboratory diet (SLD) after long-term supplementation by the diet enriched by the above mentioned proteins and amino acids. The group fed by SLD *ad libitum* was the control group. In the 2<sup>nd</sup> experiment the effect of paired-feeding of the group fed by SLD and caseine was followed up and the amount of food complied with the group fed by BCAA from the 1<sup>st</sup> experiment (long-term under-nutrition). The effect of diet supplemented by arginine (Arg) and creatine (Krea) *ad libitum* and the effect of 24-hour starving (short-term starving) was followed up in the 3<sup>rd</sup> experiment. The 4<sup>th</sup> experiment followed the effect of iron enriched diet in two different concentrations alone or in combination with repeated blood withdrawals.

In the 1<sup>st</sup> experiment was found neither the effect of glutamine nor caseine supplementation on bone mass in healthy male adult rats. The significant effect on bone mass was found after branched-chain amino acids supplementation; the lower increase in length of femur, decreased resistance of femur to bending, the decrease in bone remodelling turnover, the decrease in gain of body weight and the decrease on bone mineral density of tail vertebrae. We think that this complex deterioration of bone metabolism was caused by both the composition of diet and the decrease in diet intake. The realimentation by SLD caused the increase of bone turnover in the group supplemented by caseine and the activation of osteoblast in the group supplemented by BCAA and the decrease of bone mineral density of femur in the group supplemented by glutamine. Nevertheless, we think that the effect of the realimentation on the bone mass would occur after longer period of time.

To confirm the above mentioned hypothesis, we'd decided to follow up the effect of pair-feeding based on BCAA group by SLD and the caseine group in the 2<sup>nd</sup> experiment. Both pair-fed groups showed deterioration of bone mass status compared to the groups fed *ad libitum*. Otherwise the status of the bone mass was better in both pair-fed groups compared to the BCAA group. So we can state that the changes in the bone mass are connected not only with the amount of diet intake as well as with the quality of the diet.

In the 3<sup>rd</sup> experiment we concluded that the effect of arginine and creatine on bone was rather negative, although a deterioration of resistance of tibia to bending was found in the arginine group only. The short-term starving had a negative effect on bone tissue, because it caused the decrease in resistance of tibia to torsion only for the group SLD. The deterioration of the mechanical properties was not found for the arginine group. We even found a support of bone formation during short-term starvation for the creatine group.

Neither the iron over-supplementation nor repeated blood withdrawals resulted in changes of the bone properties to the healthy adult male of the Wistar rats. The good ability to compensate this state was due to their health and the short period of the experiment.

We didn't prove that supplementation by the chosen proteins, amino acids, iron and the combination of long-term under-nutrition, short-term starving or repeated blood withdrawals could result in serious changes of the bone mass by healthy adult male of the Wistar rats. For recognition of mechanisms by which the healthy organism can deal with the changed conditions, could be the subject of interest for the next research. The question is how could female rats, the subjects with bone or any other diseases or aged subjects react to these conditions.

### 3. Úvod do problematiky

Kost má v lidském organismu mnoho funkcí, od opěrné a ochranné, přes rezervoár minerálů (Mardon *et al.*, 2008), až po tvorbu všech typů krevních buněk. Kostní tkáň prodělává neustálou remodelaci po celou dobu života. Procesy kostní novotvorby a kostní resorpce jsou úzce spjaté. Nerovnováha mezi kostní novotvorbou a kostní resorpcí vede k narušení procesu remodelace a funkce kosti a tedy dříve či později k rozvoji onemocnění. Osteoblasty a osteoklasty jsou za celý proces remodelace kosti, její růst a odbourávání zodpovědné. Činnost kostních buněk je ovlivňována vnitřními působky, jako jsou hormony, vitamíny a minerály, ale reagují i na vnější podněty, chemické nebo mechanické.

Mechanické podněty působící na kost jsou často opomíjeny, ale o to větší je jejich vliv na stav kostní hmoty, především na odolnost kosti vůči zlomenině. Mechanickým stimulem se rozumí jakýkoliv pohyb a zátěž kosterní soustavy. Kost se vlivem zátěže přizpůsobuje, mění se postavení kostních trámčů, jejich orientace, tloušťka a tím se zvyšuje či snižuje odolnost kosti vůči zlomenině.

Chemickými podněty jsou látky, které se do organismu dostanou ve formě různých chemických sloučenin např. léků, nebo jako základní složky potravy - cukry, tuky, bílkoviny, vitamíny a minerály. Nadbytek či nedostatek potravy anebo základních složek stravy má negativní vliv na celkový zdravotní stav organismu. Otázkou však zůstává, jak velký vliv budou mít tyto změny na stav kostní tkáně.

#### 3.1 Vyšetřovací metody

K posouzení stavu kostní hmoty slouží zobrazovací metody. Ke speciálním metodám patří kostní biopsie, histomorfometrická analýza, scintigrafie a biomechanické testy.

##### 3.1.1 Zobrazovací metody

Mezi zobrazovací metody patří rentgen (RTG), metody založené na absorpci RTG záření (DXA, dvouenergieová rentgenová absorpciometrie), dále ultrazvuk, počítačová tomografie (CT) - nejčastěji periferní kvantitativní počítačová tomografie (pQCT), nebo pQCT s vysokým rozlišením (hr-pQCT, high resolution pQCT). Využívají se i metody bez nutnosti použití ionizující záření, jako magnetická rezonance (MRI), např. mikroMRI, anebo metody využívající vlastnosti radionuklidů, scintigrafie.

DXA je základní metoda při diagnostice kostních onemocnění. Stanovuje se hustota kostní tkáně a obsah minerálu vztaženého na plochu hodnocené oblasti skeletu (BMD – bone mineral density,  $g/cm^2$ ). Využívá slabé rentgenové záření o dvou energetických hladinách, které je po průchodu kostí pohlceno (Broulík, 2007). Metoda se využívá k hodnocení obratlových těl, kyčle, krčku femuru, předloktí, či celého těla, ale lze s ní měřit jakoukoliv část těla.

##### 3.1.2 Biomechanické testování

Testování mechanické odolnosti materiálu je využíváno nejen v medicíně, ale i ve stavebním, strojírenském a textilním průmyslu. V medicíně se tímto způsobem hodnotí vlastnosti uměle vyráběných náhrad a sledují se změny ve vlastnostech svalů, šlach, kostí vlivem různých podnětů.

Pevnost a elasticita kosti souvisí nejen s vlastnostmi kostní hmoty, jako je celkový objem kosti, stupeň mineralizace, podíl kolagenních a nekolagenních složek, podíl kortikální a trabekulární kosti, ale také s architektonickými vlastnostmi, tedy uspořádáním trabekulární sítě a kortikálních lamel. Pevnost kosti je dána mineralizací kosti a elasticita stavem organické složky kostní tkáně.

Testuje se odolnost vůči tlaku, odolnosti v torzi a v tahu a k tomu jsou využívány komerčně dostupné přístroje, jako je např. Instron (MAY 03, USA), Shenk-Trebel model RTP 0,6, LR5K (J. Loyd Instruments, UK), nebo tzv. „custom-made material testing machine“, (tzv. „na zakázku“ vyrobené přístroje), které jsou sice levné, ale nevýhodou je jejich jednoduchost - zaznamenávají většinou pouze maximální sílu, kterou bylo nutno vyvinout, aby došlo k fraktuře.

Modelovým zvířetem pro testování mechanických vlastností kostí je potkan. K testování se používají jak celé kosti (*femur, tibie, humerus, radius*, metatarsální kůstky, *mandibula* (Jiang *et al.*, 2008), tak části kosti, kortikální či trabekulární, upravené do geometrických tvarů (např. cylindrů).

Mezi metody testování kosti v tlaku patří kompresní test a odolnost v ohybu. Nejčastěji používaná metoda je tříbodové ohýbání (three-point bending, TPB). Metoda testuje odolnost diafýzy dlouhé kosti vůči tlaku, lze testovat také distální část femuru, nebo proximální části tibie (Herlin *et al.*, 2010). Testovaná kost se umístí na dvě podpěry, třetí čepel působí shora dolů kolmo na kost. Variabilním parametrem je vzdálenost spodních podpěr. Dle Turnera a Burra (1993) by měla být vzdálenost podpěr pevně daná - u samců potkanů 20 mm a u samic 15 mm, kdy deformace kosti bude způsobena jejím ohýbáním (Turner a Burr, 1993). Naopak Leppänen umístil jednu podpěru pod velký trochanter (*trochanter maior*) a druhou pod distální konce femuru, tím byla vzdálenost pro každou testovanou kost jiná v závislosti na velikosti kosti (Leppänen *et al.*, 2006).

Dalším parametrem je poloha kosti v průběhu testování, tedy směr působení čepel. Dává se přednost testování v antero-posteriorním směru (AP) (Järvinen *et al.*, 1998), ale tato poloha neodpovídá adaptaci kosti na zátěž *in vivo*. Leppänen *et al.*, (2006, 2010) tedy zvolil směr medio-laterální (ML), kdy má kost největší eliptický průměr diafýzy. Je nutné ji zafixovat, aby nedošlo v průběhu testování k přetočení. Tím je ovšem kost ovlivněna vnějšími vlivy (Leppänen *et al.*, 2006).

Rychlosti ohýbací síly se liší dle autora od 0,1 mm/s (Leppänen *et al.*, 2008) do 50 mm/s (Stürmer *et al.*, 2006). Někteří autoři aplikují před vlastním testem ještě stabilizující napětí od 0,5 N do 10 N (Stürmer *et al.*, 2006; Leppänen *et al.*, 2008), které brání pohybu kosti při testování.

Testované kosti je nutné důkladně a opatrně očistit a současně zabránit vysychání kosti. Samotný test probíhá většinou za pokojové teploty, jen Iwamoto *et al.* (2006) testoval tříbodové ohýbání v solné lázni při teplotě 37°C, aby se přiblížil podmínkám v organismu.

Kompresní test je vhodný k hodnocení odolnosti kosti v tlaku. Před testem je nutné ukotvit testovanou kost, k tomu se používá polyakrylamidová pryskyřice, kterou se kost zalévá ve fixačním zařízení. Pro testování odolnosti krčku femuru se používá část femuru získaná po tříbodovém ohýbání, případně celý femur. Femur je ukotven kolmo a tlak čepel působí na hlavici kyčelního kloubu. U obratlů působí čepel kolmo na vlastní tělo obratle s malým stabilizačním napětím. Používají se rychlosti od 0,93 mm/min (Herlin *et al.*, 2010) po 6 mm/min (Brzóska *et al.*, 2005).

Dalším testem je test torzní, který hodnotí smykové napětí před zlomením, zaznamenává se torzní síla (Nm). Při přípravě vzorku je nutné zafixovat oba konce kosti pomocí polyakrylamidové pryskyřice. Použitím pryskyřice nedojde k drcení konců kosti. Používá se úhlová rychlost otáčení od 6 °/s (Lepola *et al.*, 1996) po 10 °/min (Moro-Alvarez *et al.*, 2009). Důležitý je také směr torze.

Tahový test je dalším typem testu, využívá se při testování elastických materiálů, šlach a svalů, případně kostí. Kost se upevní za oba konce se stabilizačním napětím (5-10 N) a rychlost tahové zátěže se liší: např. 2 mm/min (Comelekoglu *et al.*, 2007), nebo 1 mm/s (Comelekoglu *et al.*, 2007). Vzdálenost mezi konci upevňovacího zařízení je např. 3 mm (Comelekoglu *et al.*, 2007).

### 3.1.3 Biochemické metody

K základnímu biochemickému vyšetření patří stanovení minerální složky, koncentrace vápníku, fosforu a hořčíku v séru i v moči, a stanovení hormonů ovlivňujících metabolismus vápníku: parathormon, kalcitonin a metabolity vitamínu D (kalcitriol, kalcidiol).

Dále se hodnotí vlastní parametry kostního metabolismu. Mezi markery kostní novotvorby patří kostní izoforma alkalické fosfatázy (bALP), osteokalcin (OC), amino- a karboxy-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, PICP). Jako ukazatel kostí resorpce se stanovuje amino- a karboxy-terminální telopeptidy kolagenu I (NTX-I, CTX-I), tartát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP), případně hydroxyprolin, glykosidy hydroxylyzinu, pyridinolin, deoxypyridinolin. Dále se stanovují lokální působky jako je interleukin 1 a 6 (IL-1, IL-6), tumor nekrotizující faktor (TNF), monocyto-makrofágový faktor stimulující kolonie (M-CSF), interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) kostní morfogenetický protein (BMP) a osteoprotegerin (OPG).

Sérové koncentrace celkové ALP informují o novotvorbě kostí a aktivitě osteoklastů, slouží např. k monitorování anti-resorpční terapie. Osteokalcin je nekolagenní protein produkovaný osteoblasty, část se ho uvolňuje do cirkulace, kde bývá degradován. Má krátký biologický poločas, podléhá diurnálním rytmům (Racek J., 2006) a je ovlivněn i zánětlivými onemocněními (Vyskočil, 2009). Kostní kolagen je tvořen trojšroubovicovou molekulou a vzniká v osteoblastech jako prokolagen. Na něj jsou napojeny telopeptidy a propeptidy, amoni-terminální (PINP, NTX) a karboxy-terminální (PICP, CTX), které jsou po odštěpení uvolněny do krevního oběhu (Merry *et al.*,



1976). Koncentrace cirkulujícího PINP je úměrná množství nové kostní matrix. Telopeptidy se uvolňují při odbourávání kolagenu I působením osteoklastů. Inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I) je peptid s účinky na růst, přežití a diferenciaci buněk a tkání. Sekrece IGF-I je spjata s růstovým hormonem, stimuluje proliferaci osteoblastů, tvorbu osteoprotegerinu a stimuluje expresi kolagenu typu I v osteoblastech (Canalis *et al.*, 1995). IGF-I pravděpodobně podporuje osteoklastogenezi tvorbou RANK-L v osteoklastech (Mochizuki *et al.*, 1992). Kostní morfogenetické proteiny (BMPs, bone morphogenetic proteins) jsou součástí nadrodiny TGF $\beta$  a hrají roli v buněčné diferenciaci a funkci osteoblastů.

## **3.2 Aminokyseliny**

### **3.2.1 Glutamin**

Suplementace glutaminem a jinými aminokyselinami, především větvenými (valin, leucin a izoleucin) se využívá nejen k regeneraci a růstu svalové hmoty v kulturistice (Shimomura *et al.*, 2006) nebo v atletice (Gleeson, 2005), ale také k léčbě proteokatabolických stavů, tj. popálenin, krvácení, sepsí (Newsholme a Hardy, 1997) a též u pacientů po transplantaci kostní dřeně (Ziegler *et al.*, 2002; Mora Lde *et al.*, 2002). Glutamin je neesenciální aminokyselina, podílí se na detoxikaci amoniaku a udržování acidobazické rovnováhy (Holeček, 2006), je prekurzorem pro syntézu glutathionu (Mora Lde *et al.*, 2002).

### **3.2.2 Arginin**

Arginin je podmíněně esenciální bazická aminokyselina, Arginin je prekurzorem pro syntézu oxidu dusnatého (NO), kreatinu a polyaminů. Suplementace argininem má pozitivní vliv na proteinovou bilanci, regeneraci poškozené tkáně a imunitní systém (Holeček, 2006).

### **3.2.3 Kreatin**

Kreatin je neesenciální dusíkatá látka, která slouží v organismu jako zdroj energie pro mozek a svaly. Kreatin je vyhledávaný sportovci i v medicíně, např. při nervosvalových poraněních (Kley *et al.*, 2013), u Duchennovy svalové dystrofie (Louis *et al.*, 2003) a brání kostním ztrátám (Chilibeck *et al.*, 2005), zhoršení hodnot cholesterolu, paměti a inteligence (Rae *et al.*, 2003).

### **3.2.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem**

Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA, branched-chain amino acids) jsou valin, leucin a izoleucin. Jedná se o esenciální aminokyseliny, které stimulují proteosyntézu, jsou doporučovány u proteokatabolických stavů. Syrovátka, zdroj BCAA, je užívána atlety pro regulaci hmotnosti a tukové tkáně (Baer *et al.*, 2011; má ale i medicínský význam: brání kostním ztrátám (Zhou *et al.*, 2011; Hannan *et al.*, 2000), zvyšuje koncentrace IGF-I (Schürch *et al.*, 1998).

### **3.2.5 Kasein**

Kasein je mléčný protein, který se odděluje při srážení mléka spolu s tuky od syrovátky. Je tvořen vysokým podílem prolinu a hydrofobních aminokyselin a je významným zdrojem vápníku a fosfátů, podporuje absorpci vápníku střevem.

## **3.3 Nedostatek nebo nadbytek proteinů v potravě**

Příjem proteinů v potravě má pozitivní vliv na svalovou sílu se zlepšením pohybových schopností. Pohyb je obecně prospěšný pro kost. Příjem proteinů má pozitivní vliv na BMD, BMC (obsah minerálu v kosti) a snižuje hladiny markerů kostní resorpce (Darling *et al.*, 2009). Již 4 týdny bez pohybu mají negativní vliv na kostní hmotu (Geinoz *et al.*, 1993, Bonjour *et al.*, 2005). Deficit proteinů s nedostatkem vápníku a vitamínu D vede k rozvoji osteoporózy, převážně u starších lidí. I pouhý deficit proteinů může snížit kostní síly ovlivněním mikroarchitektoniky kosti (Kerstetter *et al.*, 2003), přes pokles hladin IGF-I (Ammann *et al.*, 2002). Nadměrný příjmem proteinů zvyšuje odbourávání kostí zvýšenou tvorbou kyselin (Weiss *et al.*, 1981) s poklesem pH. Nepoměrem mezi osteoklasty a osteoblasty narůstá riziko osteoporotické zlomeniny (Bonjour, 2005).

### 3.4 Hladovění

Hladovění je stav organismu, kdy nepřijímá potravu a využívá vlastních zásob. Má tři fáze: fáze časná – metabolismus jaterního glykogenu během 2-3 hodin; fáze adaptace – metabolismus tuků během 12 hodin; a fáze metabolismu svalové tkáně, nad 24 hodin (Holeček, 2006; McCue, 2010).

Během hladovění se zvyšují počty receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory gamma (PPAR $\gamma$ ), s diferenciací k adipocytům (Gimble *et al.*, 1996), klesají koncentrace estrogenu a IGF-I, s možným úbytkem kostní hmoty (Zhang *et al.*, 2012).

Při hladovění hrají roli i reaktivní formy kyslíku (Scherz-Shouval *et al.*, 2007) buď jako signalizační molekuly (Veal *et al.*, 2007) nebo zábranou autofagie (Desideri *et al.* (2014). Hladovění stimuluje kostní resorpci s uvolněním vápníku z hydroxyapatitu (Potts, 2005), snižuje tělesnou hmotnost a kostní tkáň reaguje kostní resorpcí (Frost, 1987; Frost, 2003; Devlin, 2011).

### 3.5 Železo

Význam železa pro kosti ukazuje skutečnost, že osteoblasty jsou citlivé k nadbytku železa, naopak osteoklasty ne (Weinberg, 2008). Železo je mikrobiogenní, neboli stopový, prvek. Je součástí řady enzymů, např. prolyl a lysyl hydroxylázy, 25hydroxyvitamin D-1-hydroxylázy, ribonukleotid-reduktázy. Nadbytek železa tak i jeho nedostatek může vést k řadě onemocnění (talasémie, srpkovitá anémie, africká sideróza, hereditární hemochromatóza (HHE)). Rovnováha železa v organismu je udržována pouze absorpcí z trávicího traktu.

Až u 50 % pacientů, kteří mají v organismu vyšší koncentrace železa, byla zjištěna osteoporóza (Weinberg, 2006). Toxicita železa pro organismus souvisí s tvorbou volných radikálů (Matshushima *et al.*, 2001). Léčebná metoda u těchto stavů je flebotomie, neboli odběr 250 – 500 ml krve (Adams a Barton, 2010), kdy se stimuluje erytropoéza a mobilizuje železo ze zásob. S flebotomií se setkáváme také u dárců krve, kteří jsou naopak ohroženi nedostatkem železa (Cançado *et al.*, 2001), zvláště premenopauzální ženy. Chronické ztráty krve stimulují stromální a hematopoetický systém a stávají se faktorem rozvoje osteoporózy (Gurevitch *et al.*, 2007).

## 4. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo sledovat vliv výživy, omezení příjmu potravy, hladovění a odběrů krve na mechanické vlastnosti kostní tkáně a změny kostního metabolismu.

Jednotlivé cíle:

1. vliv aminokyselin a bílkovin:
  - a. vliv glutaminu
  - b. vliv argininu
  - c. vliv kreatinu
  - d. vliv větvených aminokyselin
  - e. vliv kaseinu
  - f. vliv realimentace standardní laboratorní dietou
  - g. vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy
  - h. vliv krátkodobého hladovění
2. vliv nadbytku a nedostatku železa:
  - a. vliv nadbytku železa
  - b. vliv opakovaných odběrů krve

Během studie jsem prováděla:

- zavedení metodiky testování mechanických vlastností femurů a tibií
- stanovení koncentrace kostních markerů v séru a v kostním homogenátu metodou ELISA
- stanovení koncentrace celkového vápníku a železa v séru a v tibií
- měření kostní minerální hustoty (BMD) metodou DXA
- vyhodnocování BMD skeletu a těla (poměr svalové a tukové tkáně)
- preparace femurů a tibií z potkana *post mortem*
- příprava homogenátu z kostní tkáně

## 5. Experimentální část

### 5.1 Experiment s podáváním aminokyselin a bílkoviny

#### 5.1.1 Experimentální dieta

Diety se zvýšeným obsahem aminokyselin a bílkovin byly připraveny ze sypké směsi standardní laboratorní diety (SLD, VELAS a.s., Lysá nad Labem, ČR) přidáním aminokyselin.

Dieta se zvýšeným obsahem glutaminu (GLN) byla připravena z 16,6 g glutaminu doplněné SLD do celkové hmotnosti 100 g. Dieta obohacená o arginin a kreatin (Arg, Krea) byla připravena ze SLD přidáním argininu ve výsledné koncentraci 10 %, tj. 10 g argininu nebo kreatinu doplněno SLD do 100 g. Dieta obohacená o větvené aminokyseliny (BCAA) byla obohacená o valin, leucin a izoleucin (1:2:1), tj. 28,7 g směsi BCAA doplněno SLD do 100 g. Dieta obohacená o kasein (KAS) obsahovala 19,7 g kaseinu doplněného SLD do 100 g. Výchozí SLD dieta obsahovala 24 % dusíkatých látek.

S využitím kuchyňského robotu na výrobu klobás (Tefal LE HACHOIRE 710) byly vytvořeny válečky, které byly poté usušeny v horkovzdušném sterilizátoru (Stericell BMT Medical Technology s.r.o., Brno, ČR) při teplotě 55°C. Diety byly skladovány na chladném a suchém místě.

#### 5.1.2 Experimentální zvířata

Protokoly pokusů byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání LFUK-HK a byly v souladu se správnou laboratorní praxí (č. j. 30793/2010-30; 24746/09-30; 2705/2009-30; 9814/2008-30; 9813/2008-30; 8593/2008-30).

Samci potkanů kmene Wistar (Biotest a.s., Konárovice) byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LFUK-HK) v plastových klecích (3 kusy/klec) za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22±2°C, vlhkost vzduchu 30-70 %). S výjimkou vybraných skupin, měla zvířata přístup k potravě a vodě *ad libitum* po celou dobu experimentu. Všechny operace byly provedeny v celkové anestézii párami éteru ve funkční digestoři.

#### 5.1.3 Experiment s dietou obohacenou o aminokyseliny a bílkovinu

Potkani ve věku 6 týdnů s tělesnou hmotností 172,6±3,8g na počátku experimentu byli rozděleni do 8 skupin po 6 zvířatech a krmeni *ad libitum* dietami:

1. skupina SLD: krmena standardní laboratorní dietou
2. skupina GLN: krmena SLD obohacenou o glutamin
3. skupina BCAA: krmena SLD obohacenou o valin, leucin a izoleucin
4. skupina KAS: krmena obohacenou o kasein
5. skupina SLD-R: krmena SLD do konce pokusu (R=realimentace)
6. skupina KAS-R: krmena KAS a týden před usmrcením převedena na SLD
7. skupina BCAA-R: krmena BCAA a týden před usmrcením převedena na SLD
8. skupina GLN-R: krmena GLN a týden před usmrcením převedena na SLD

Za 15 týdnů byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty.

#### 5.1.4 Experiment s dietou obohacenou o arginin

Potkani s tělesnou hmotností 236±5 g byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. skupina ST1-S byla živena standardní laboratorní dietou *ad libitum*
2. skupina Arg-S byla živena SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*

Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty.

#### 5.1.5 Experiment s dietou obohacenou o kreatin

Potkani s tělesnou hmotností 233±4 g byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. skupina ST1-S byla živena standardní laboratorní dietou *ad libitum*
2. skupina Krea-S byla živena SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*

Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty.

### 5.1.6 Experiment s dlouhodobým omezením příjmu potravy – párové krmení

Další dvě skupiny po 6 zvířatech dostávaly stejné množství diety, které odpovídalo spotřebě diety u skupiny BCAA krmené *ad libitum* – tj. párově krmeni vůči BCAA

1. skupina SLD-P: krmena SLD v množství, které odpovídalo spotřebě BCAA
  2. skupina KAS-P: krmena KAS v množství, které odpovídalo spotřebě BCAA
- Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty.

### 5.1.7 Experiment s krátkodobým hladověním

Potkani s tělesnou hmotností 234±4 g byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. skupina SLD-S byla živena SLD *ad libitum*
2. skupina SLD-H živena SLD *ad libitum* a 24 hodin před usmrcením hladověla.

Potkani s tělesnou hmotností 235±4 g byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. skupina Arg-S byla živena SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*
2. skupina Arg-H živena Arg *ad libitum* a 24 hodin před usmrcením hladověla.

Potkani s tělesnou hmotností 234±4 g byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. skupina Krea-S byla živena SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*
2. skupina Krea-H živena Krea *ad libitum* a 24 hodin před usmrcením hladověla.

Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty.

## 5.2 Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve

### 5.2.1 Experimentální dieta

Diety se zvýšeným obsahem železa byly připraveny přidáním rozdrčených tablet železa (Sorbifer Durules, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapešť, Maďarsko) s obsahem 100 mg elementárního železa Fe<sup>2+</sup> a 60 mg kyseliny askorbové v jedné tabletě do standardní laboratorní diety (SLD). První dieta, fe, obsahovala 400 mg elementárního železa a 240 mg kyseliny askorbové na 1 kg diety. Druhá dieta, FE+, obsahovala 5 g elementárního železa a 3 g kyseliny askorbové na 1 kg diety. V kuchyňském robotu (Tefal LE HACHOIRE 710) byly vytvořeny válečky, které byly poté usušeny v horkovzdušném sterilizátoru (Stericell BMT Medical Technology s.r.o., Brno, ČR) při teplotě 55°C. Takto připravené diety byly skladovány na chladném a suchém místě.

### 5.2.2 Experimentální zvířata

Protokoly pokusů byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání LFUK-HK a byly v souladu se správnou laboratorní praxí (č. j. 24774/2006-11020).

Zdraví dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest s.r.o., Konárovice, ČR) byli chováni v plastových klecích (3 kusy/klec) za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22±2°C, vlhkost vzduchu 30–70 %). Zvířata měla přístup k potravě *ad libitum* po celou dobu experimentu. Zvířata krmená SLD pila hořký černý čaj *ad libitum*, který byl uvařen z pitné vody, ze které bylo odstraněno železo (Brita Matra, Německo), ostatní skupiny pily běžnou vodu *ad libitum*. Všechny operace byly provedeny v celkové anestézii párami éteru ve funkční digestoři.

Potkani ve věku 8 týdnů (BW 315±7 g) byli rozděleni do 6 skupin po 6 zvířatech:

1. skupina SLD byla živena SLD *ad libitum*, bez opakovaných odběrů krve
2. skupina SLD-w byla živena SLD, opakované odběry krve 1krát týdně (w)
3. skupina fe živena SLD dietou obohacenou o železo v dávce 400 mg/ kg diety
4. skupina fe-w živena SLD s železem (400 mg/ kg), odběry krve 1krát týdně
5. skupina FE+ byla živena SLD dietou obohacenou o železo v dávce 5 g/1 kg diety
6. skupina FE+w živena SLD s železem (5 mg/ kg diety), odběry krve 1krát týdně

Odběry krve (1 ml/100 g tělesné hmotnosti) byly odebírány týdně z retroorbitálního plexu kapilárami do mikrozkuřavek s heparinem (Heparin Léčiva, heparinum natricum 5 000 m.j/ml, Zentiva, ČR). Po 10 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z břišní aorty.

## 5.3 Materiál a metody

### 5.3.1 Příprava vzorků

Po usmrcení byly zvířatům vyjmuty orgány (játra, slezina, střevo, plíce, srdce a ledviny) a byla změřena kostní minerální hustota, poté byly vyjmuty femury, tibie a část ocasních obratlů.

### 5.3.2 Homogenizace

Homogenáty byly připraveny z proximální části tibie (150 mg kostní tkáň + 1,5 ml fosfátového pufru) s použitím třepačky s keramickou kuličkou (Lysing Matrix A, MP Biomedicals, LLC, USA) na přístroji MagNA Lyser (Roche Applied Science, Německo).

### 5.3.3 Biochemická analýza

#### 5.3.3.1 Experiment s podáváním aminokyselin a bílkovin

- **Stanovení kostních markerů**

Koncentrace kostních markerů v séru (OC, PINP a CTX-I) a v kostním homogenátu (PINP, bALP, CTX-I, BMP2 a IGF-I) byla stanovena metodou ELISA s kity od firmy Immunodiagnostic Systems Ltd. (Velká Británie) a Uscnlife Sciences & Technology Co., Ltd. (Čína).

#### 5.3.3.2 Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve

- **Stanovení parametrů krevního obrazu**

Byl stanoven krevní obraz a APTT (parciální tromboplastinový čas) a Quickův test (INR, international normalization ratio) (Abbott CELL-DYN 3200 SL, Abbott, IL, USA).

- **Stanovení koncentrace železa, feritinu v séru, obsahu železa a vápníku v kostech**

Koncentrace železa v séru byla stanovena na přístroji Modular Roche, Mannheim, Německo). Obsah železa a vápníku v tibií byl stanoven metodou atomové absorpční spektrometrie na analyzátoru AAS DUO 280 Z + 240 FS (Varian Australia Pty Ltd, Austrálie). Koncentrace feritinu byla stanovena metodou ELISA (RatFerritin, µg/l, Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA).

- **Stanovení kostních markerů**

V séru byly metodou ELISA stanoveny markery kostního metabolismu: OC, PINP, CTX-I pomocí kitů firmy Immunodiagnostic Systems Ltd. (Velká Británie).

### 5.3.4 Denzitometrické vyšetření

Po usmrcení byla zvířatům změřena celotělová kostní minerální hustota (BMD, g/cm<sup>2</sup>) metodou DXA na přístroji HologicDelphi A (QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). BMD bylo hodnoceno ve třech oblastech – femur, bederní a ocasní obratle použitím softwaru určeného pro měření malých zvířat (DXA, Hologic, MA, USA). Dále byl stanoven celotělový obsah tělesného tuku a svalové tkáň (lean+BMC).

### 5.3.5 Testování mechanické odolnosti kostní tkáň

- **Testování elektromechanického přístroje „custom-made material testing machine“ lámáním skleněných tyček**

Pro validaci metody tříbodového ohýbání byl přístroj otestován lámáním skleněných tyček (hematokritových kapilár).

- **Testování mechanické odolnosti kostní tkáň**

Mechanická odolnost kostní tkáň byla hodnocena pomocí na zakázku vyrobeného elektromechanického přístroje (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, ČR).

Byla testována odolnost diafýzy femuru nebo tibie v tlaku při tzv. tříbodovém ohýbání, odolnost krčku femuru v tlaku a odolnost tibie v torzi. Po celou dobu testování byly kosti baleny do gázy namočené ve fyziologickém roztoku k zábraně vysoušení.

Před samotným testem tříbodovým ohýbáním byla změřena délka, průměr a vyznačen střed kosti. Podpurné body byly vzdálené od sebe 18 mm a třetí bod - váleček o průměru 7 mm zatížil střed kosti předtížením do 10 N a poté byl spouštěn dolů rychlostí 6 mm/min (Turner a Burr, 1993). Kost byla v anteroposteriorním směru. Snímací a zobrazovací jednotky (BURSTER 8435-6005 a

9180-V3000, Burster praezisiosmesstechnik GmbH, Gernsbach, Německo) zaznamenaly sílu vyvinutou na kost válečkem v momentu zlomení. Poté byla mikrometrem změřena tloušťka kortikální kostní tkáně na distální části femuru v místě zlomu.

K testování odolnosti v torzi byly použity tibie. Konec tibie se zafixoval samopolymerující pryskyřicí (Spofacryl-SpofaDental a.s.; Jičín, ČR) ve fixačním zařízení. Vzdálenost mezi zatavenými konci byla 22 mm. Po spuštění přístroje se začala jedna část otáčet rychlostí 5°/minutu až došlo ke zlomení tibie. Druhá část byla fixní. Síla nutná ke zlomení kosti v torzi byla změřena snímací jednotkou a zaznamenána zobrazovací jednotkou (BURSTER typ 8651-4500 (0,5 Nm) a 9162-V2000, Burster praezisiosmesstechnik GmbH, Gernsbach, Německo).

Testování tlakové odolnosti krčku femuru bylo provedeno po zlomení femuru. Zlomený proximální konec femuru byl kolmo usazen do samopolymerující pryskyřice. Na hlavici femuru kolmo dolů v ose femuru tlačila nerezová tyčka se zakulaceným koncem s předtížením do 10 N a poté rychlostí 6 mm/min. Maximální síla vynaložená ke zlomení krčku femuru byla změřena snímačem a zaznamenána zobrazovací jednotkou obdobně jako u tříbodového ohýbání.

### 5.3.6 Statistická analýza a zpracování dat

Statistická analýza byla provedena na Oddělení výpočetní techniky LFUK-HK softwarem NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). Pro porovnání parametrů mezi skupinami v experimentu s aminokyselinami a bílkovinami byla jako první krok použita analýza rozptylu. Při statistické významnosti analýzy rozptylu bylo provedeno mnohonásobné porovnání Bonferroni test s kontrolou nebo Dunnettův test s kontrolou. Při porovnání dvou skupin (realimentace a párové krmení) byl použit nepárový dvouvýběrový t-test s případnou Bonferroni modifikací. Výsledky experimentu s argininem a kreatinem byly statisticky zpracovány programem SigmaStat 3.1 JandelScientific® (San Rafael, CA, USA) pomocí nepárového t-testu a Mann-Whitney testu. K posouzení významnosti výsledků experimentu se železem byly použity tyto testy: dvouvýběrový t-test, v případě zamítnutí normality neparametrický Mann-Whitney Rank Sum Test, nebo Kolmogorov-Smirnov test s Bonferroniho modifikací. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, v případě neparametrických hodnot jako medián a 25. a 75. percentil. Hodnoty  $p < 0,05$  a nižší byly považovány za signifikantní. Hladina významnosti byla zvolena  $\alpha = 0,05$ .

## 6. Výsledky

### 6.1 Validace přesnosti přístroje

Všechny skleněné tyčky byly stejně dlouhé (75 mm) a jejich hmotnost byla  $171,2 \pm 4,4$  mg. Zvyšováním počtu lámaných tyček rovnoměrně narůstala síla nutná ke zlomení. Při lámání 15 tyček bylo nutné vynaložit sílu  $101,545 \pm 9,419$  N, tedy blízké síle nutné ke zlomení kosti.

### 6.2 Vliv diety obohacené o glutamin

U potkanů s dietou s GLN došlo k mírnému zlepšení odolnosti femurů při tříbodovém ohýbání a byla zaznamenána nižší tělesná hmotnost a procento tělesného tuku vs. SLD bez statistické významnosti. Nebyl zjištěn rozdíl v biomechanických vlastnostech pravého ani levého femuru, ani rozdíly v BMD vlivem diety GLN. Koncentrace CTX-I v kostním homogenátu skupiny GLN byla signifikantně vyšší ( $p < 0,05$ ), naopak v séru nižší, ale bez statistické významnosti. Podobný nevýznamný trend byl sledován i u ostatních kostních markerů, pokles koncentrace PINP a OC v séru a zvýšení koncentrace PINP a BALP v kostním homogenátu u skupiny GLN vs. SLD.

### 6.3 Vliv diety obohacené o arginin

Potkani živení dietou Arg (Arg-S) měli významně nižší obsah tělesného tuku ( $p < 0,05$ ), přičemž se nelišili v tělesné hmotnosti ani spotřebě diety od kontrol (ST1-S). Biomechanické testy prokázaly, že pravá tibia skupiny Arg-S je méně odolná vůči ohybu ( $p < 0,01$ ) a levá tibia je slabší v průměru ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s ST1-S. Ostatní hodnoty (tloušťka, torze, průměr femurů) byly nesignifikantně nižší u Arg-S vs. ST1-S. Délka levé i pravé tibie a BMD hodnocených oblastí byla u

obou skupin téměř shodná. Koncentrace PINP po 12 týdnech podávání Arg poklesla ve srovnání s ST1-S ( $p < 0,05$ ), naopak nevýznamně vzrostly hodnoty CTX-I u Arg-S vs. ST1-S.

#### **6.4 Vliv diety obohacené o kreatin**

U potkanů s dietou Krea bylo nižší množství svalové tkáně ( $p < 0,05$ ) i obsah tuku ( $p < 0,001$ ), nevýznamně nižší tělesná hmotnost, naopak vyšší spotřeba diety vůči kontrole (ST1-S). Podávání diety Krea vedlo k menší tloušťce pravé tibie ve srovnání s ST1-S ( $p < 0,05$ ), ostatní parametry biomechanických vlastností kostí se nelišily. V homogenátu kostí skupiny Krea-S nevýznamně poklesly markery kostního obratu, PINP, BALP, BMP-2 a CTX-I, kromě IGF-I, který naopak nevýznamně vzrostl ve srovnání se skupinou ST1-S.

#### **6.5 Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny**

Potkani živení dietou s BCAA měli nižší tělesnou hmotnost na konci pokusu ( $p < 0,001$ ), nižší nárůst kostí do délky u pravého ( $p < 0,01$ ) i levého femuru ( $p < 0,001$ ) a byla naměřena menší síly nutná ke zlomení levého femuru ( $p < 0,05$ ) ve srovnání se skupinou kontrolní. Průměr, tloušťka a síla nutná ke zlomu krčku byly u BCAA nevýznamně nižší vs. SLD. U skupiny BCAA poklesly koncentrace CTX-I v séru ( $p < 0,05$ ) vůči SLD. Nižší hustota kostního minerálu byla u potkanů BCAA v oblasti femuru ( $p < 0,001$ ) a v ocasních obratlích ( $p < 0,05$ ) vs. SLD. Skupina BCAA měla nevýznamně méně tělesného tuku a nižší tělesnou hmotnost na konci pokusu vs. SLD ( $p < 0,001$ ).

#### **6.6 Vliv diety obohacené o kasein**

Dieta s kaseinem neovlivnila biomechanické vlastnosti kostí, ani koncentrace kostních markerů v séru a kostním homogenátu ani kostní minerální hustotu v porovnání se skupinou kontrolní. Nevýznamně nižší byla tělesná hmotnost a množství tělesného tuku u KAS vs. SLD.

#### **6.7 Vliv realimentace SLD**

##### **6.7.1 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein**

U potkanů dříve živených dietou KAS a po týdenní realimentaci dietou SLD (KAS-R), došlo k nárůstu koncentrace CTX-I v séru ( $p < 0,05$ ) i v kostním homogenátu ( $p < 0,001$ ) a k nárůstu koncentrace PINP v séru ( $p < 0,05$ ) ve srovnání se skupinou KAS. V ostatních sledovaných parametrech nedošlo ke změnám ve srovnání s KAS.

##### **6.7.2 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny**

U potkanů živených dietou s BCAA (BCAA-R) po týdenní realimentaci dietou SLD došlo k významnému nárůstu koncentrace CTX-I ( $p < 0,05$ ) a BALP ( $p < 0,001$ ) v kostním homogenátu vs. BCAA. Ostatní hodnoty kostních markerů ani dalších sledovaných parametrů se nezměnily.

##### **6.7.3 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin**

U potkanů GLN-R po týdenní realimentaci dietou SLD nedošlo k žádnému významnému rozdílu ve sledovaných parametrech ani v biomechanických vlastnostech vs. GLN. U potkanů GLN-R signifikantně klesla BMD ve femuru ( $p < 0,05$ ) vůči GLN. Vlivem realimentace nevýznamně vzrostla tělesná hmotnost a klesl tělesný tuk u skupiny GLN-R vs. GLN.

#### **6.8 Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – párové krmení**

##### **6.8.1 Párové krmení standardní laboratorní dietou**

U skupiny SLD-P, která byla krmena párově vůči skupině BCAA, byla snižená odolnost ke zlomení diafýzy levého ( $p < 0,05$ ) i pravého ( $p < 0,01$ ) femuru vs. SLD *ad libitum*. Párové krmení vedlo k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti ( $p < 0,05$ ) i tělesného tuku ( $p < 0,01$ ) vs. SLD *ad libitum*. Kostní minerální hustota byla nižší v oblasti femuru ( $p < 0,01$ ) u skupiny SLD-P vs. SLD *ad libitum*. Omezené množství diety neovlivnilo kostní markery ani biomechanické vlastnosti kostí. Při porovnání skupin SLD-P a BCAA (obě přijímaly stejné množství potravy, ale s jiným obsahem

proteinů) měli potkani SLD-P vyšší tělesnou hmotnost ( $p < 0,05$ ), delší levý ( $p < 0,001$ ) i pravý femur ( $p < 0,01$ ) a nižší koncentrace PINP v kostním homogenátu ( $p < 0,05$ ) oproti skupině BCAA.

### **6.8.2 Párové krmení dietou obohacenou o kasein**

U skupiny KAS-P, živené dietou s KAS ve stejném množství jako skupina BCAA, významně poklesla odolnosti krčků femurů v tlaku (vpravo  $p < 0,05$ , vlevo  $p < 0,05$ ) vs. KAS *ad libitum*. Nebyly nalezeny změny v biomechanických vlastnostech, v kostních markerech, ani v kostní minerální hustotě, pouze nesignifikantně nižší tělesná hmotnost a obsah tělesného tuku u KAS-P vs. KAS *ad libitum*. I přes stejné množství přijímané potravy, ale s rozdílným složením bílkovin, měla skupina KAS-P delší levý ( $p < 0,001$ ) i pravý ( $p < 0,01$ ) femur, větší průměr pravého femuru ( $p < 0,05$ ), odolnější levý femur při tříbodovém ohýbání ( $p < 0,05$ ), vyšší hodnoty kostní minerální hustoty v bederních ( $p < 0,05$ ) a ocasních obratlích ( $p < 0,05$ ) a vyšší tělesnou hmotnost ( $p < 0,05$ ) vůči skupině BCAA. V koncentracích kostních markerů v kostním homogenátu nebyly zjištěny rozdíly.

## **6.9 Vliv krátkodobého hladovění**

### **6.9.1 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety**

Vlivem 24hodinového hladovění u skupiny živené standardní laboratorní dietou (ST1-H) poklesla tělesná hmotnost ( $p < 0,001$ ), množství tělesného tuku, dále byla nalezena větší tloušťka kortikální kosti ( $p < 0,05$ ) a větší odolnost v torzi ( $p < 0,01$ ) pravé tibie vůči skupině nehladovějící (ST1-S). Biomechanické vlastnosti kostí, koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu a kostní minerální hustota nebyly hladověním ovlivněny.

### **6.9.2 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin**

Hladovění vedlo u skupiny živené dietou s argininem (Arg-H) k poklesu tělesné hmotnosti ( $p < 0,01$ ), k menší tloušťce kortikální kosti pravé tibie ( $p < 0,05$ ) a k nárůstu koncentrace IGF-I v homogenátu kosti ( $p < 0,05$ ). Hladovění nevedlo ke změnám v biomechanických vlastnostech kostí, v koncentracích kostních markerů v kostním homogenátu ani ke změnám v kostní minerální hustotě.

### **6.9.3 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin**

Vlivem hladovění skupiny s dietou s kreatinem (Krea-H) klesla tělesná hmotnost ( $p < 0,001$ ), zvětšila se tloušťka kortikální kosti levé tibie ( $p < 0,001$ ), vzrostla koncentrace BMP2 v kostním homogenátu ( $p < 0,05$ ) vůči nehladovějící skupině Krea-S. Nezměnily se další parametry, tj. množství svalové a tukové tkáně, biomechanické vlastnosti kostí, kostní markery, kostní minerální hustota.

## **6.10 Vliv železa a opakovaných odběrů krve**

### **6.10.1 Vliv nadbytku železa v dietě**

Nadbytek železa v potravě zvýšil koncentrace hemoglobinu (FE+ vs. fe,  $p < 0,01$ , FE+ vs. SLD,  $p < 0,05$ ), železa v séru (FE+ vs. fe, SLD;  $p < 0,001$ ), obsah železa a vápníku v kosti (FE+ vs. SLD,  $p < 0,001$ ; fe vs. SLD,  $p < 0,01$ ) ve srovnání s kontrolou SLD, nárůst přímo úměrně závisel na dávce železa. Naopak poklesly počty erytrocytů u obou diet s železem (FE+ vs. SLD,  $p < 0,001$ ; fe vs. SLD,  $p < 0,05$ ) vs. SLD. Diety se železem nenavodily rozdíly v tělesné hmotnosti zvířat, koncentraci feritinu a kostních markerů, ani v hustotě kostního minerálu a mechanických vlastnostech kostí.

### **6.10.2 Vliv opakovaných odběrů krve u jednotlivých typů diet**

Opakované odběry krve v množství 0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti u skupiny krmené SLD (SLD-w) vedly vůči SLD k poklesu počtu erytrocytů ( $p < 0,05$ ) a ke zvýšení obsahu vápníku v kosti ( $p < 0,01$ ). U skupiny s vyšší dávkou železa (FE+w) poklesly po odběrech krve počty leukocytů ( $p < 0,05$ ) a poklesly koncentrace železa v séru ( $p < 0,05$ ). Vlivem krevních odběrů u všech skupin nesignifikantně klesl počet erytrocytů, leukocytů, sérové koncentrace feritinu a železa, obsah železa



v kosti, nárůst tělesné hmotnosti a nesignifikantně vzrostla koncentrace OC u skupin se železem. Hodnoty dalších markerů kostního obratu se vlivem odběrů nezměnily. U žádné z diet nevedly opakované odběry krve ke změně hustoty kostního minerálu ani biomechanických vlastností kostí.

## 7. Diskuse

### 7.1 Vliv diety obohacené o glutamin na metabolismus kostí

Glutamin je využíván jako doplněk stravy sportovců či při léčbě závažných stavů. Proto se většina autorů zabývala jeho vlivem na svalovou hmotu, játra nebo imunitní systém, ale velmi málo se zabývali vlivem na kostní tkáň (Ziegler *et al.*, 2002; Mora Lde *et al.*, 2002; Tatara *et al.*, 2004; Tatara *et al.*, 2005; Tatara *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2008; Schürch *et al.* 1998). V experimentu jsme pozorovali ve shodě s literaturou menší nárůst tělesné hmotnosti a nižší obsah tuku v organismu vs. SLD. Obeid *et al.* (2005) pozoroval nižší nárůst tělesné hmotnosti u potkanů krmených glutaminem (40 g/1 kg diety). Spíše existují práce zabývající se vztahem kostí a alfa-ketoglutarátu (AKG), který je prekurzorem pro syntézu glutamátu a glutaminu. Po dlouhodobém podávání AKG krocánům (Tatara *et al.*, 2004) a prasnicím (Andersen *et al.*, 2008), byl zaznamenán nárůst kortikální a trabekulární kosti tibie a femuru a také jejich větší mechanickou odolnost. Podobně v našem experimentu jsme zjistili nesignifikantní zlepšení biomechanických vlastností. Efekt může být zprostředkován vyšší dostupností prolinu, který je klíčový v tvorbě kolagenu (Seibel, 2005), neboť Tatara *et al.* (2005) zjistil jeho zvýšení po podání AKG. U potkanů GLN byly i vyšší lokální koncentrace markerů kostního metabolismu, zvláště CTX-I.

Domníváme se, že pozitivní vliv glutaminu byl zajištěn jeho deaminací na glutamát, který ovlivňuje anabolické změny v osteocytech pomocí glutamátergí inervace (Andersen *et al.*, 2008).

### 7.2 Vliv diety obohacené o arginin na metabolismus kostí

U potkanů živěných dietou s argininem byl významně snížený obsah tělesného tuku ve srovnání s kontrolou, ale bez rozdílů tělesné hmotnosti a spotřeby diety vůči ST1-S. Je prokázáno, že příjem L-argininu v potravě snižuje obsah břišního tuku, hladinu cholesterolu a triglyceridů u brojlerů (Fouad *et al.*, 2013). Kulturisté přijímají vyšší dávky L-argininu, protože stimuluje nárůstu tělesné hmotnosti i svalové hmoty. V našem experimentu jsme toto nepotvrdili.

Menší průměr diafýzy pravé tibie, menší odolnost při tříbodovém ohýbání levé tibie korespondují se změnami v metabolismu kostí (významný pokles PINP, mírný nárůst CTX-I). Tyto změny ukazatelů kostního metabolismu souvisí s tvorbou matrix, nemusí ale souviset s následnou mineralizací kostní matrix. Naše výsledky nejsou v souladu s následujícími výsledky. Pozitivní vliv podávání argininu na tvorbu kostního kolagenu i na kostní minerální hustotu byl sledována u mladých samic potkanů (Choi a Chang, 2013). U postmenopauzálních žen, s příjmem argininu 3x denně po 6 měsících, zjistili nárůst koncentrace PICP, ale nenalezli změny v koncentraci IGF-I a hodnotách BMD, což dle autorů souvisí s formou podávaného argininu (Baecker *et al.*, 2005). Autoři uzavírají, že L-arginin, jakožto prekurzor NO (Castillo *et al.*, 1993) může zvýšit produkci NO a tak pozitivně ovlivnit metabolismus kostí.

Domníváme se, že malý efekt diety Arg by mohla způsobit jeho horší dostupnost při užití *per os*, což bylo zjištěno některými autory (Bode-Böger *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1993). V jiných studiích (Blum *et al.*, 2000, Hurson *et al.*, 1995) autoři prokázali, že L-arginin indukuje uvolňování růstového hormonu, což následně vede ke zvýšení IGF-I v séru. Tento efekt jsme nepotvrdili, spíše naopak IGF-I mírně pokles v kostním homogenátu. Novější práce naopak naznačují, že podání L-argininu nestimuluje sekreci růstového hormonu, kortizolu, ani IGF-I (da Silva *et al.*, 2014).

Horší mechanické vlastnosti kostí potkanů Arg, jakožto následek snížené novotvorby a zvýšeného odbourávání kostí, mohou souviset s poklesem tukové tkáně v organismu. Klíčovým faktorem ale zůstává doba, způsob podání a chemické složení podávaného argininu.

### 7.3 Vliv diety obohacené o kreatin na metabolismus kostí

Potkani živěni dietou s kreatinem měli nižší množství svalové a tukové tkáně vůči ST1-S, přesto nebyly rozdíly v nárůstu hmotnosti mezi skupinami. Těmito výsledky jsme v rozporu s literaturou, kde podávání kreatinu zvyšuje tělesnou hmotnost, svalovou hmotu, sílu a odolnost vůči únavě (Chrusch *et al.*, 2001) a zlepšuje výkon při každodenních činnostech (Gotshalk *et al.*, 2008;

Rawson a Clarkson, 2000; Rawson *et al.*, 1999; Stout *et al.*, 2007). Vyšší množství svalové tkáně je výhodné pro kostní tkáň, neboť brání zhoršování osteoporózy (Crepaldi a Maggi, 2005), snižuje počty pádů (Clegg *et al.*, 2013). Nižší tělesná hmotnost, méně svalové i tukové tkáně méně stimuluje kosti, což vede k adaptaci s nižším obsahem kostní hmoty (Vyskočil, 2009). Mnozí autoři naopak nenašli žádný důkaz o pozitivním účinku kreatinu na svalovou sílu (Bemben *et al.*, 2010; Bermon *et al.*, 1998; Eijnde *et al.*, 2003; Eliot *et al.*, 2008).

Ve studii Antolice *et al.* (2007), kde se zlepšily parametry a mechanické vlastnosti femuru vlivem kreatinu, jsme shodně našli nárůst kostní minerální hustoty, ale naopak poklesla tloušťka pravé tibie a zhoršila se mechanická odolnost tibie skupiny Krea-S. Pokles novotvorby kostí byl kompenzován nárůstem koncentrací IGF-I v kostním homogenátu vs. ST1-S. Ve studiích s kreatinem u mužů zjistili zvýšení kostní minerální hustoty v bederní páteři (Louis *et al.*, 2003; Tarnopolsky *et al.*, 2004) a v oblasti horní končetiny (Chilibeck *et al.*, 2005). U ovariektomovaných samic potkanů došlo k zvýšení obsahu fosfátu v bederních kostech, což svědčí o zlepšení kvality kosti (de Souza *et al.*, 2012). Pozitivní vliv kreatinu na menší úbytek BMD krčku femuru a nárůst tloušťky kosti femuru byl zjištěn u postmenopauzálních žen (Beck *et al.*, 2011), u Duchennovy svalové dystrofie a u starších trénujících osob (Louis *et al.*, 2003, Chilibeck *et al.*, 2005).

Koncentrace všech kostních markerů u potkanů Krea byly nevýznamně nižší. Domníváme se, že útlum kostního obratu, může vést finálně k nárůstu množství kostní tkáně. Neboť kreatin stimuluje vývoj a diferenciaci kostních buněk, zvyšuje metabolickou aktivitu a diferenciaci osteoblastů a děje závislé na energii kreatinkinázové reakce (Antolic *et al.*, 2007, Funanage *et al.*, 1992, Gerber *et al.*, 2005). I přesto na základě našich výsledků se domníváme, že kreatin podávaný v 10% koncentraci měl spíše negativní vliv na kvalitu kostní tkáně.

#### **7.4 Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny na metabolismus kostí**

Sledovali jsme změny stavu kostní hmoty vlivem větvených esenciálních aminokyselin: valin, leucin, izoleucin. BCAA jsou využívány jako doplněk stravy sportovců, ale také u nemocných, nejčastěji při popálení nebo sepsi. Vliv BCAA byl spíše věnován vlivu na svalovou hmotu, na kostní tkáň minimálně s rozporuplnými závěry.

V experimentu Aparicio *et al.* (2011) s potkany měla vysokoproteinová dieta s obsahem syrovátky, zdrojem BCAA, ochranný efekt na kostní minerál a snížila hladiny cholesterolu ve srovnání s kontrolou. Potkani měli nižší příjem potravy, nižší procento tuku a vyšší nárůst svalů ve srovnání se standardní dietou, ale nedošlo k ovlivnění kostní hmoty. Efekt vysokoproteinové diety souvisí s potřebou dostatečného příjmu vápníku, draslíku a jiných minerálů společně s proteiny a aminokyselinami (Massey, 2003). V naší studii jsme neprokázali pozitivní vliv zvýšeného příjmu proteinu na funkci osteoblastů u zvířat živených BCAA. Vlivem diety BCAA byl významně menší nárůst obou femurů do délky, menší síla nutná ke zlomení levého femuru, pokles koncentrace CTX-I v séru, nižší nárůst tělesné hmotnosti a nižší kostní minerální hustota v oblasti ocasních obratlů a femuru vs. SLD. I u ostatních hodnocených parametrů jsme zaznamenali nesignifikantní pokles.

Tuk a BMI mají inverzní vztah ke kostní resorpci a pozitivní vztah ke kostní hmotě. Vyšší tělesná hmotnost vede ke zvýšené stimulaci kosti a tím k vyšší kostní hmotě (Vyskočil, 2009; Mardon *et al.*, 2008). Tuk je tedy „ochráncem“ kostí. U skupiny BCAA, která měla významně nižší nárůst tělesné hmotnosti vůči SLD skupině, se ochranný efekt tuku na kostní tkáň neprojevil.

Suplementace esenciálními aminokyselinami (leucin, lyzin, izoleucin, fenylalanin, valin atd.) u samic potkanů s ovariektomií a nízkoproteinovou dietou zlepšuje mechanické vlastnosti kostí pravděpodobně přes nárůst koncentrace IGF-I (Ammann *et al.*, 2002). V našem experimentu se zdravými samci potkanů jsme však toto zlepšení mechanických vlastností kostí nepozorovali.

Domníváme se, že námi zjištěné změny v kostní tkáni vlivem BCAA, které nasvědčují spíše zhoršení stavu kostní hmoty, a výše popsaný efekt hmotnost na kostní hmotu je vyvolán nejen obsahem BCAA v dietě, ale také sníženým příjmem diety, nejspíš pro chuťovou neatraktivnost.

#### **7.5 Vliv diety obohacené o kasein na metabolismus kostí**

V experimentu byl pro sledování změn stavu kostní hmoty vybrán kasein jako proteinová kontrola, v jejímž složení jsou zastoupeny všechny aminokyseliny v ideálním procentuálním složení.

Vlivem diety s kaseinem podávané zdravým potkanům po 15 týdnů v dávce 19,7 g/100g SLD nedošlo k ovlivnění parametrů kostí, mechanických vlastností, koncentrací kostních markerů,

ani ke změnám v kostní minerální hustotě ve srovnání s kontrolou SLD. Byl pozorován nevýznamně nižší nárůst tělesné hmotnosti a obsahu tělesného tuku ve srovnání s kontrolou.

Proteiny mají na kost pozitivní vliv převážně zvýšením hladiny IGF-I, klíčového regulátoru kostního metabolismu (Canalis *et al.*, 1993), jehož hladiny jsou úzce spjaty s nutričním stavem, obzvláště s příjmem proteinů (Chevalley *et al.*, 2010). IGF-I je znám svým pozitivním účinkem na kostní tkáň - stimuluje růst kostní hmoty, podporuje diferenciaci a metabolickou aktivitu osteoblastů a kostní mineralizaci (Gerber *et al.*, 2005).

Kvalita podávaného proteinu má na stav kostí malý vliv. I když bylo ve studii Mardon *et al.* (2008) u zvířat krmených kaseinem prokázáno vyšší množství trabekul, vyšší hodnoty BMD a koncentrace osteokalcinu vůči skupině živé syrovátkou. Tento nálezn souvisí pravděpodobně s pomalým vstřebáváním kaseinu a s tím související pomalejší pokles pH organismu. Čím pomalejší pokles pH organismu, tím lépe dokáže organismus udržet acidobazickou rovnováhu a zabránit tak uvolňování vápníku z kostí a tím jejich resorpci (Mardon *et al.*, 2008).

Mardon *et al.* (2009) nenalezl u potkanů při podávání diety s obsahem 26 % kaseinu změny tělesné hmotnosti, BMD, biomechanických vlastností a kostních remodelačních markerů ve srovnání s kontrolou. Autoři připisují tento výsledek malým rozdílům v obsahu proteinů ve vysokoproteinové a standardní laboratorní dietě, 26 % vs. 13 %. Naopak Amanzadeh *et al.* (2003) prokázal hyperkalciurii a hypocitráturii a ztrátu kostní hmoty vlivem suplementace dietou s obsahem 48 % kaseinu u 8 týdenních samců potkanů. Rozdíl v obsahu proteinů mezi experimentální skupinou a kontrolní byl v této studii vyšší (48 % vs. 12 %). Není jasné, zda kostní ztráty jsou způsobené přímo zatížením kyselinami, nebo k nim dochází sekundárně vlivem prostaglandinů nebo cytokinů. V naší studii jsme podávali dietu s obsahem 20 % kaseinu a naše výsledky jsou v souladu s výsledky Mardon *et al.* (2009).

Ovariektomované samice nebo orchiektomovaní samci potkanů jsou používáni jako model osteoporózy u lidí. U starších lidí s osteoporózou se také často setkáváme s proteinovou podvýživou. Jak již bylo zmíněno je proteinová podvýživa úzce spjata se sníženou koncentrací IGF-I, klíčovým regulátorem metabolismu kostí (Chevalley *et al.*, 2010).

Na zvířecích modelech osteoporózy, navozenou ovariektomií a proteinovou podvýživou, byl sledován pozitivní vliv suplementace mléčnými proteiny zvýšením hladiny IGF-I stimulující kostní novotvorbu (Ammann *et al.*, 2002). Ovariektomie zhoršuje stav kostí převážně trabekulárních. Deficit estrogenů příliš nemění kortikální kostní hmotu, alespoň tedy u hlodavců. Naopak snížený příjem proteinů ovlivňuje hlavně kortikální kostní hmotu. Což může být vysvětleno tím, že na rozdíl od ovariektomie, deficit příjmu proteinů nevede ke zvýšení hladin IGF-I (Ammann *et al.*, 2002).

Schürch *et al.* (1998) ve své studii zjistil, že příjem mléčných proteinů u lidí s frakturou krčku kosti stehenní vede k vyšším hladinám IGF-I, snižuje kostní ztrátu v oblasti proximálního femuru a zkracuje dobu hospitalizace. Ve studii se staršími pacienty s vyšším příjmem proteinů byly nalezeny vyšší hodnoty BMD krčku femuru a také lepší svalová síla a výkon (Geinoz *et al.*, 1993).

Některé studie prokázaly ovšem i negativní vliv proteinů na kost. Studie u žen s vysokoproteinovou dietou ukázaly, že vlivem diety stoupá kostní resorpce a u zvířat vede k vyššímu výskytu fraktur předloktí a kyčle (Sellmeyer *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1981; Talbott *et al.*, 2001).

V naší studii jsme neovlivnili stav kostní hmoty suplementací kaseinem. Domníváme se, že pozitivní vliv kaseinu na kostní hmotu jsme neprokázali, protože se jednalo o zdravé nekastované samce a negativní účinek se neprojevil v závislosti na koncentraci kaseinu v potravě, která se pohybovala ve „fyziologických dávkách“.

## **7.6 Vliv realimentace SLD na metabolismus kostí**

### **7.6.1 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein**

Vlivem realimentace SLD po 14 týdnech diety s nadbytkem kaseinu došlo k významnému navýšení koncentrací CTX-I v séru a v kostním homogenátu a PINP v séru vůči skupině bez realimentace. Zvýšená koncentrace PINP v séru naznačuje stimulaci tvorby nové kostní matrix. Naopak nárůst koncentrace CTX-I jak v séru, tak kostním homogenátu hovoří pro zvýšenou resorpci kosti.

Domníváme se, že realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety KAS vede ke zvýšení kostního obratu, který se nestihl odrazit ve změnách mechanických vlastností kostí, ani v BMD.

### **7.6.2 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny**

Vlivem 1 týdenní realimentace na SLD došlo k významnému nárůstu koncentrace BALP a CTX-I v homogenátu kostí. Hodnota koncentrace CTX-I dosahuje příliš velkých odchylek, proto je potřeba tento výsledek opatrně interpretovat. Zvýšená koncentrace BALP svědčí pro zvýšenou kostní tvorbu. Dále došlo k nesignifikantnímu nárůstu tělesné hmotnosti bez vlivu na množství tukové tkáně. Mírné navýšení celkové tělesné hmotnosti po 1 týdnu realimentace SLD opět svědčí pro neatraktivnost diety obohacené o BCAA. Doba realimentace byla však příliš krátká, aby se její efekt mohl projevit ve změně mechanických vlastností kostí nebo v BMD.

### **7.6.3 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin**

Vlivem 1 týdenní realimentace SLD u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem glutaminu došlo ke snížení BMD pouze v oblasti femuru. Stejně jako u skupiny BCAA-R je vlivem realimentace u skupiny GLN-R patrný nesignifikantní nárůst tělesné hmotnosti s mírným poklesem obsahu tukové tkáně. Domníváme se, že při dlouhodobějším působení realimentace SLD by mohlo následně dojít k ovlivnění biomechanických vlastností kostí i koncentrací kostních markerů.

## **7.7 Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy - vliv párového krmení na metabolismus kostí**

Princip párového krmení spočívá v podávání přesně odměřených dávek krmení dle porovnávání skupiny. V našem případě jsme omezili množství podávané SLD a diety KAS dle spotřeby diety BCAA podávané *ad libitum*. Tyto skupiny s párovým krmením jsme porovnávali jak se skupinami krmenými stejnou dietou *ad libitum*, tak se skupinou krmenou dietou BCAA. V experimentu bylo hodnoceno, zda sledované parametry jsou ovlivněny kvalitativním nebo kvantitativním složením diety.

Vlivem párového krmení, bylo u skupiny SLD-P i KAS-P ve srovnání se skupinou krmenou stejnou dietou *ad libitum* (SLD, KAS) zjištěno statisticky významné zhoršení tříbodového ohýbání u obou femurů, nižší nárůst tělesné hmotnosti a snížení obsahu celkového tělesného tuku.

Porovnáme-li párově krmené skupiny SLD-P a KAS-P se skupinou BCAA krmenou *ad libitum*, dojdeme k závěru, že obě párově skupiny měla signifikantně lepší parametry kostí, KAS-P navíc větší mechanickou odolnost LF, vyšší nárůst tělesné hmotnosti a vyšší BMD. Významnou roli tedy hraje i složení podávané potravy.

Domníváme se, že zhoršení stavu kostí jak u skupiny BCAA v předchozím experimentu, tak u párově krmených skupin, je tedy pravděpodobně způsobeno několika úzce souvisejícími faktory, jako je nižší nárůst tělesné hmotnosti, tedy čím menší zvíře, tím menší mechanická stimulace kostí vedoucí ke kratším a slabším kostem. V souvislosti s nižší hmotností odpadá dobře známý ochranný vliv tuku na kostní tkáň. Pokles mechanické stimulace kosti by pravděpodobně mohl souviset se signifikantním poklesem koncentrace markeru kostní novotvorby (PINP) a mírným nárůstem koncentrace markeru kostní resorpce (CTX-I) v kostním homogenátu, které jsou patrné u všech skupin párově krmených ve srovnání se skupinami krmenými *ad libitum* i skupinou BCAA, i když většinou nejsou signifikantní. Tento pokles kostního obratu může být dalším faktorem vedoucím ke zhoršení stavu kostní hmoty pozorovaného u dlouhodobě hladovějících skupin zvířat.

Ovšem velký vliv na změny v kostní hmotě má také kvalitativní složení diety. Vůči skupině BCAA byl u obou párově krmených skupin lepší stav parametrů kostí, mechanických vlastností kostí i větší nárůst tělesné hmotnosti. Důležitý je tedy nejen dostatečný příjem potravy, ale také kvalitativní složení přijímané potravy.

## **7.8 Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostí**

### **7.8.1 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety**

Hladovění po dobu 24 hodin před usmrcením vedlo u skupiny ST1-H krmené standardní laboratorní dietou k poklesu množství tělesného tuku. Hladovění vedlo k poklesu tloušťky kortikální kosti a odolnosti v torzi a nevýznamně u tříbodového ohýbání jen u pravé tibie vs. ST1-S.

Osteoblasty a adipocyty pocházejí ze stejné populace mezenchymálních kmenových buněk (Hong *et al.*, 2005). Mezi nimi je udržována dynamická rovnováha, odklon od linie osteoblastů vede

ke zvýšené produkci adipocytů (Muruganandan *et al.*, 2009, Nuttall a Gimble, 2004). V současné době je tuková tkáň chápána nejen jako zdroj energie, ale produkcí adipokinů má mnoho dalších úloh v organismu. Podílí se na řadě různých funkcí včetně metabolismu kostí (Scotece *et al.*, 2014).

Domníváme se, že při krátkodobém hladovění u potkanů s dostatkem tukové tkáně je kostní tkáň šetřena a nepřesměruje metabolismus kostí ke zvýšené osteoresorpci. Předpokládáme, že již po 24 hodinách hladovění může kostní tkáň dostávat informace o poklesu tělesné hmotnosti a množství tukové tkáně a může se připravovat i na odpovídající změny v kostním metabolismu, vedoucí v konečném důsledku k poklesu pevnosti kosti. Tuto hypotézu bude ještě nutné ověřit.

### **7.8.2 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin**

Hladovění po dobu 24 hodin vedlo u skupiny krmené dietou obohacenou o 10 % arginin k poklesu tělesné hmotnosti, ale ne k poklesu tělesného tuku a svalové tkáně. Domníváme se, že zvířata sice neměla nadbytečný tuk, který by mohla v době hladovění odbourávat, ale i tak dokázala hladovění velmi dobře kompenzovat.

Podle Fouarda *et al.* (2013) dlouhodobý příjem argininu má pozitivní vliv na obsah tuku v těle. U potkanů živěných argininem jsou v metabolismu přednostně využívány mastné kyseliny, což je doprovázeno nízkou hladinou IGF-I (Fazeli *et al.*, 2010a). Nález nižších hodnot IGF-I u potkanů Arg-S vs. ST1-S tuto metabolickou cestu spíše potvrzuje. Koncentrace IGF-I v kostním homogenátu významně vzrostly teprve po 24 hodinách bez diety s argininem. Domníváme se, že tímto nárůstem by mohl být obnoven efekt IGF-I na tvorbu kosti (tj. tendence k vzestupu BALP).

Jedna z teorií vysvětlující vliv argininu na kostní tkáň, je přes jeho metabolit, oxid dusnatý (NO). L-arginin, jakožto přirozený prekurzor NO, může zvýšit produkci NO a pozitivně tak ovlivnit metabolismus kostí (Baecker *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 1993). Předpokládáme, že u potkanů s dietou Arg, vzrostla tvorba NO, ale bez konečného pozitivního efektu. Mnohé práce totiž tvrdí, že vhodnější než kontinuální podávání NO je jeho intermitentní aplikace (Wimalawansa *et al.*, 1997).

Hladovění po dobu 24 hodin bylo příliš krátkodobé, aby navodilo jednoznačné změny v biomechanických vlastnostech nebo v hodnotách BMD.

### **7.8.3 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin**

V předchozí studii s podáváním kreatinu jsme sice neprokázali změny v biomechanických vlastnostech kostí, přesto se domníváme, že dieta Krea měla spíše negativní vliv na kostní tkáň. Proto předpokládáme, že vysazení diety bohaté na kreatin se odrazilo v kostní tkáni pozitivně – větší tloušťka kortikální kosti, nárůst koncentrace BMP2. Je pravděpodobné, že mohly ještě přetrvávat určité zásoby kreatinu nebo jeho sloučenin v těle potkanů a tím oddálit efekt jeho nedostatku.

## **7.9 Vliv železa a opakovaných odběrů krve na metabolismus kostí**

V našem experimentu jsme se snažili podáváním železa v nadbytku a opakovanými krevními odběry navodit situaci podobnou u dárců krve, kteří z důvodů pravidelných ztrát krve často užívají preparáty železa. Sledovali jsme jak vliv samotného železa na kostní tkáň, tak vliv opakovaných odběrů krve u zdravých samců potkanů.

### **7.9.1 Vliv nadbytku železa v dietě**

Potkanům po 10 týdnů byla dávana dieta se zvýšeným obsahem železa, ve dvou koncentracích, 400 mg/kg diety, která odpovídá 12násobku množství podávanému průměrnému dospělému člověku a 5 g/kg diety, což odpovídá 150násobku příjmu u člověka.

Vlivem diet obohacených železem byl pozorován vzrůstu hladin hemoglobinu, koncentrace železa séru a obsahu železa a vápníku v kosti, naopak byl paradoxně pozorován pokles počtu erytrocytů. Guggenbuhl *et al.* (2008) předpokládá, že železo má přímý vliv na mineralizaci kostí inhibicí růstu a změnou kvality krystalů hydroxyapatitu *in vitro*. Autor našel negativní korelaci mezi koncentrací železa v játrech a BMD krčku femuru, nikoliv však u BMD bederních obratlů (Guggenbuhl *et al.*, 2005). K podobným závěrům dospěl i Kudo *et al.* (2008), v jehož studii vedlo předávkování železem k poklesu hmotnosti zvířat a k poklesu BMD v oblasti femuru s následným

rozvojem osteoporózy. Existuje však studie s pozitivní korelací železa v dietě a BMD bederních obratlů, trochanteru, krčku femuru, Wardova trojúhelníku a celého těla (Harris *et al.*, 2003).

Zvýšení hladin markerů kostní tvorby i kostní resorpce a pokles koncentrace parathyroidního hormonu (PTH) pozoroval ve studii s dietou obohacenou o železo Matsushima *et al.* (2001). Objem kosti, tloušťka a počet trabekul ale poklesly. Autor se odkazuje na tvorbu hydroxylového radikálu, případně na přímý vliv iontu železa na enzym kostní resorpce, tartát rezistentní ACP. V další studii zjistil Matsushima *et al.* (2003) zvýšené ukládání železitých iontů na povrchu kosti, kde došlo ke ztluštění stěn osteoidu a k rozvoji osteomalacie. V našem experimentu jsme také zjistili vyšší obsah železa v kostní tkáni. Rozdílné výsledky těchto dvou studií (Matsushima *et al.*, 2001; Matsushima *et al.*, 2003) odráží základní vlastnosti kostních buněk, tedy rychlé odbourávání kosti osteoklasty (po 2. a 4. týdnech diety) a pomalejší novotvorba kosti pomocí osteoblastů (po 13. týdnech diety). Zvýšené ukládání železa v osteoblastech i osteoklastech zjistil již v roce 1984 Vernejoul *et al.* Ovšem pouze uvnitř osteoblastů vedlo železo k poklesu počtu a aktivity těchto buněk, poklesu doplňování kostní hmoty a snížení syntézy kolagenu. Tuto myšlenku potvrzuje nález osteoporózy až u 25 % pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) (Valenti *et al.*, 2009).

V naší studii jsme i přes vysoké koncentrace podávaného železa pozorovali pouze zvýšený obsah železa v kostech potkanů u obou diet obohacených o železo ve srovnání se skupinou na standardní dietě, ale nedošlo k ovlivnění kostní hmoty. Vysvětlením by mohlo být příliš krátké trvání experimentu (10 týdnů), během něhož se nestihl projevit efekt podávaného železa na vlastnosti kostní hmoty.

### **7.9.2 Vliv nadbytku železa v dietě a opakovaných odběrů krve**

V našem experimentu byl hodnocen vliv opakovaných odběrů krve (1x týdně 0,5 ml/kg tělesné hmotnosti) na metabolismus kostí u standardní laboratorní diety a u obou diet se zvýšeným obsahem železa podávaných po 10 týdnů.

U skupiny se SLD-w vlivem odběrů poklesly počtu erytrocytů a vzrostl obsah vápníku v kosti ve srovnání se skupinou bez odběrů (SLD). Nesignifikantně byl zpomalen nárůst tělesné hmotnosti, poklesly počty leukocytů, koncentrace feritinu, železa v séru i v kosti, naopak vzrostl obsah vápníku v kosti.

Vlivem suplementace železem (400 mg/kg diety) byl patrný statisticky nevýznamný trend k poklesu počtu erytrocytů, leukocytů, koncentrace feritinu, železa v séru a železa v kosti vůči skupině fe bez krevních odběrů.

U skupiny více suplementované železem (5 g/kg diety) došlo vlivem opakovaných krevních odběrů k významnému poklesu počtu leukocytů i koncentrace železa v séru vs. FE+. Tento pokles je v souladu s výsledky studii Cançado *et al.* (2001), kteří zjistili, že u dárců krve vedou odběry krve k rozvoji deficitu železa. U žen k tomu stavu vede již první odběr, zatímco u mužů až pravidelné odběry (Javadzadeh Shahshashani *et al.*, 2005). V mnoha studiích byl prokázán pozitivní vliv suplementace železem na úpravu krevního obrazu po odběru krve (Røsvik *et al.*, 2010). Gurevitch *et al.* (2007) potvrdili, že chronické ztráty krve jsou primárním faktorem rozvoje osteoporózy, pravděpodobně vyčerpáním stromálního a hematopoetického systému neustálou stimulací.

Výše zmíněnou myšlenku Guggenbuhla *et al.* (2008) či Gurevitche *et al.* (2007), že s nárůstem množství železa v organismu klesá kvalita kosti a s jeho poklesem naopak kvalita kosti se zlepšuje, podporuje zjištění vyššího obsahu vápníku v kosti u skupiny se standardní laboratorní dietou a opakovanými odběry krve.

Z našich výsledků je patrné, že potkani velmi dobře kompenzovali nadbytek železa přijímaného *per os* jeho sníženým vstřebáváním. Také úspěšně kompenzovali pravidelné krevní ztráty, nejspíš proto, že jednalo o zdravé dospělé samce. Nedošlo tedy k ovlivnění kostního metabolismu vlivem diety se zvýšeným obsahem železa, ani vlivem opakovaných krevních odběrů.

## 8. Závěry

- **Dieta s glutaminem** (16,6 g/100 g SLD) vedla k navýšení koncentrace CTX-I v kostním homogenátu ve srovnání se SLD. Zvýšení koncentrací ostatních markerů v kostním homogenátu a naopak jejich pokles v séru, zlepšení mechanických vlastností kostí, nižší nárůst tělesné hmotnosti a nižší spotřeba diety po 14 týdnech podávání diety nebyly signifikantní. Neprokázali jsme ani negativní, ani pozitivní vliv diety s glutaminem na stav kostní hmoty.
- **Dieta obohacená o arginin** (10 g/100 g SLD) po dobu 12 týdnů vedla k poklesu obsahu tuku ve srovnání s kontrolní skupinou, ovšem bez vlivu na celkovou tělesnou hmotnost. Byl prokázán negativní vliv na kostní tkáň snížením kostní novotvorby a mírně zvýšeným odbouráváním kostí (pokles PINP a nevýznamný nárůst CTX-I), který se projevil signifikantním zhoršením odolnosti levé tibie v ohybu a menším průměrem pravé tibie. Toto zhoršení se neprojevilo ve změně BMD. Efekt podání argininu na kostní hmotu byl spíše negativní.
- **Dieta obohacená o kreatin** (10 g/100 g SLD) po 12 týdnech vedla k poklesu množství svalové tkáně a obsahu tuku, ale beze změn v celkové tělesné hmotnosti. Dieta s kreatinem vedla pouze ke snížení tloušťky kortikální kosti u tibie. Ostatní výsledky, jako pokles mechanické odolnosti tibie, pokles kostního obratu kompenzovaný zvýšením koncentrace IGF-I, byly nevýznamné. Domníváme se, že efekt kreatinu na kost v námi podávané dávce byl spíše negativní.
- **Dieta obohacená o BCAA** (28,7 g/100 g SLD) vedla ke zhoršení všech parametrů femurů, významně však jen k nižšímu nárůstu femurů do délky po 15 týdnech diety. Toto zhoršení se projevilo nižší odolností femuru v ohybu a mírným snížením odolnosti krčku femuru vůči tlaku. Účinek BCAA se projevil také poklesem kostního obratu (nižší CTX-I v séru). Dieta vedla k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti a ke snížení BMD v oblasti ocasních obratlů a diafýzy femuru ve srovnání se skupinou SLD. Domníváme se, že všechny výše popsané změny ve stavu kostní tkáně, jsou pravděpodobně vyvolané jak samotnou dietou, tak jejím sníženým příjmem.
- **Dieta obohacená o kasein** (19,7 g/100 g SLD) představovala v našem experimentu proteinovou kontrolu. Neprokázali jsme jakékoliv ovlivnění stavu kostní hmoty dietou s kaseinem ve srovnání s kontrolou SLD. Nejspíše proto, že jsme použili zdravé samce potkanů a obsah kaseinu v dietě byl v rámci fyziologických mezí.
- **Realimentace SLD po příjmu diety s kaseinem** po dobu 1 týdne vedla k navýšení kostního obratu (vzestup hladin CTX-I v séru a v kostním homogenátu, vzestup PINP v séru), který se ale vzhledem k době trvání realimentace nestačil promítnout do změn stavu kostní tkáně.
- **Realimentace SLD po příjmu diety s BCAA** trvajícím 1 týden pravděpodobně vedla k aktivaci osteoblastů (vzestup koncentrace BALP v kostním homogenátu). Ovšem vzhledem ke krátké době trvání realimentace nedošlo k ovlivnění parametrů či vlastností kostní hmoty.
- **Realimentace SLD po příjmu diety s glutaminem**, 1 týden trvajícím realimentace SLD způsobila pokles BMD v oblasti femuru. Předpokládáme, že až dlouhodobější realimentace by mohla vést ke změnám v biomechanických vlastnostech či v koncentracích kostních markerů.
- **Párové krmení SLD** vedlo ke snížení odolnosti femurů v ohybu, nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti a poklesu obsahu tělesného tuku ve srovnání se skupinou SLD krmenou *ad libitum*. Naopak v porovnání se skupinou BCAA krmenou *ad libitum* měla párově krmená skupina SLD-P lepší parametry femuru (délka kosti), ale nižší koncentrace PINP v kostním homogenátu svědčící pro sníženou kostní novotvorbu.
- **Párové krmení KAS** zhoršilo odolnost krčků femurů vůči tlaku ve srovnání se skupinou krmenou KAS *ad libitum*. Naopak ve srovnání se skupinou BCAA živenou *ad libitum* byly parametry kostí (délka i průměr femurů) větší, kosti byly odolnější vůči ohybu a měly vyšší hustotu kostního minerálu. Také nárůst tělesné hmotnosti byl větší.
- **Párové krmení souhrn**: Párové krmení nám v naší studii ukázalo, že sice menší množství přijímané potravy vedlo ke zhoršení kvality kostní tkáně, ale pokud je její složení vyvážené, tak negativní dopad na kost je mírnější, než když se k nedostatku potravy připojí ještě její nevyvážené složení. Předpokládáme, že roli hraje také kombinace snížené mechanické stimulace kosti a chybějící ochranný vliv tukové tkáně (při omezeném příjmu diety).

- **Krátkodobé hladovění u SLD** vedlo k poklesu tělesné hmotnosti, snížení množství tukové tkáně a ke zhoršení biomechanických vlastností kostí versus u SLD živé *ad libitum*. Předpokládáme, že již 24 hodin trvajících hladovění vede k negativním změnám v kostní tkáni.
- **Krátkodobé hladovění u diety s argininem** snížilo tělesnou hmotnost, ne však obsah tuku a svalové tkáně ve srovnání se sytými. Potkani sice neměli nadbytečný tuk, který by mohli při hladovění odbourávat, ale i tak hladovění dobře kompenzovali. Nejspíš bylo hladovění příliš krátké, aby se změny v biomechanických vlastnostech nebo v hodnotách BMD projevíly.
- **Krátkodobé hladovění u diety s kreatinem** zvětšilo tloušťku kortikální kosti tibie a došlo k podpoře kostní novotvorby (zvýšení koncentrace BMP2). Což naznačuje, že vysazení diety bohaté na kreatin mělo spíše pozitivní vliv na stav kostní tkáně.
- **Železo v dietě** v obou dávkách (400 mg/kg; 5 g/kg diety) podávané po 10 týdnů vedlo k nárůstu hladin hemoglobinu a železa v séru i obsahu železa a vápníku v kosti. Naopak klesl počet erytrocytů. Nejspíš pro krátké trvání experimentu se vliv železa neprojevil změnou stavu kostní tkáně. Svůj vliv zde má i velmi dobrá regulace příjmu železa potkany.
- **Opakované krevní odběry** (0,5 ml krve/100 g tělesné hmotnosti) po 10 týdnů vedly k poklesu počtu erytrocytů a k zvýšení obsahu vápníku v kosti u skupiny SLD, kostní tkáň ale nebyla ovlivněna. Krmení dietou se železem (400 mg Fe/kg) nevedlo k žádným změnám. U skupiny krmené dietou s železem (5 g Fe/kg) poklesly vlivem odběrů počty leukocytů i koncentrace železa v séru. Potkani v našem experimentu odběry krve velmi dobře kompenzovali. Domníváme se, že opakované odběry krve spolu s doplňováním železa jsou z pohledu kostních změn relativně bezpečné.

Závěrem lze říci, že námi vybrané složky potravy, ať již bílkoviny, aminokyseliny či železo, ovlivnily stav kostní hmoty u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar jen velmi mírně. Stejně tak stavy spojené s omezením potravy, hladověním nebo opakované odběry krve vedly jen k mírným změnám v kostní tkáni. Tato zjištění nás vedou k závěru, že zdravý organismus dokáže tyto vlivy velmi dobře kompenzovat. K rozpoznání mechanismů této schopnosti kompenzace bude potřeba další výzkum.



## 9. Použitá literatura

1. ADAMS, P.C. - BARTON, J.C. How I treat hemochromatosis. *Blood*, 2010, vol.116, no. 3, s. 317-325.
2. AMANZADEH, J. - GITOMER, W.L. - ZERWEKH, J.E. - PREISIG, P.A. - MOE, O.W. - PAK, C.Y. - LEVI, M. Effect of high protein diet on stone-forming propensity and bone loss in rats. *Kidney Int*, 2003, vol. 64, no. 6, s. 2142-2149.
3. AMMANN P, LAIB A, BONJOUR JP, MEYER JM, EGSEGGER PR, ROZZOLI R. Dietary Essential Amino Acid Supplements Increase Bone Strength by Influencing Bone Mass and Bone Microarchitecture in Ovariectomized Adult Rats Fed an Isocaloric Low-Protein Diet. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, vol. 17, no. 7, s. 1264-1272.
4. ANDERSEN, N.K. - TATARA, M.R. - KRUPAMI, W. - MAJCHER, P. - HARRISON, A.P. The long effect of  $\alpha$ -ketoglutarate, given early in postnatal life, on bone growth and various bone parameters in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2008, vol. 92, no. 5, s. 519-528.
5. ANTOLIC, A. - ROY, B.D. - TARNOPOLSKY, M.A. - ZERNICKE, R.F. - WOHL, G.R. - SHAUGHNESSY, S.G. - Bourgeois, J.M.. Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2007, vol. 39, no. 5, s. 816-820.
6. APARICIO, V.A. - NEBOT, E. - PORRES, J.M. - ORTEGA, F.B. - HEREDIA, J.M. - LÓPEZ-JURADO, M. - RAMÍREZ, P.A. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *British Journal of Nutrition*, 2011, vol. 105, no. 6, s. 836-845.
7. BAECKER, N. - BOESE, A. - SCHOENAU, E. - GERZER, R. - HEER, M. L-Arginine, the Natural Precursor of NO, Is Not Effective for Preventing Bone Loss in Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, vol. 20, no. 3, s. 471-479.
8. BAER, D.J. - STOTE, K.S. - PAUL, D.R. - HARRIS, G.K. - RUMPLER, W.V. - CLEVIDENCE, B.A. Whey protein but not soy protein supplementation alters body weight and composition in free-living overweight and obese adults. *The Journal of Nutrition*, 2011, vol. 141, no. 8, s. 1489-1494.
9. BECK, T.J. - KOHLMEIER, L.A. - PETTIT, M.A. - WU, G. - LEBOFF, M.S. - CAULEY, J.A. - NICHOLAS, S. - CHEN, Z. Confounders in the association between exercise and femur bone in postmenopausal women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2011, vol. 43, no. 1, s. 80-89.
10. BEMBEN, M.G. - WITTEN, M.S. - CARTER, J.M. - ELIOT, K.A. - KNEHANS, A.W. - BEMBEN, D.A. The effects of supplementation with creatine and protein on muscle strength following a traditional resistance training program in middle-aged and older men. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2010, vol. 14, no. 2, s. 155-159.
11. BERMON, S. - VENEMBRE, P. - SACHET, C. - VALOUR, S. - DOLISI, C. Effects of creatine monohydrate ingestion in sedentary and weight-trained older adults. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998, vol. 64, no. 2, s. 147-155.
12. BODE-BÖGER, S.M. - BOGER, R.H. - GALLAND, A. - TSIKAS D. - FRÖLICH, J.C. L-Arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1998, vol. 46, no. 5, s.489-497.
13. BONJOUR, J.P. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *Journal of the American College of Nutrition*, 2005, vol. 24, no. 6 Suppl, s.526S-536S.
14. BRZÓSKA, M.M. - GALAŻYN-SIDORCZUK, M. - ROGALSKA, J. - ROSZCZENKO, A. - JURCZUK, M. - MAJEWSKA, K. - MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Beneficial effect of zinc supplementation on biomechanical properties of femoral distal end and femoral diaphysis of male rats chronically exposed to cadmium. *Chemico-Biological Interaction*, 2008, vol 171, vol. 3, s. 312-324.
15. BRZÓSKA, M.M. - MAJEWSKA, K. - MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Mechanical Properties of Femoral Diaphysis and Femoral Neck of Female Rats Chronically Exposed to Various Levels of Cadmium. *Calcified Tissue International*, 2005, vol. 76, no. 4, s. 287-298.
16. BRZÓSKA, M.M. - 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, vol. 34, no. 3, s. 517-526.
17. CANALIS, E. - PASH, J. - VARGHESE, S. Skeletal growth factors. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 1993, vol. 3, no. 3, s. 155-166.
18. CANALIS, E. - RYDZIEL, S. - DELANY, A.M. - VARGHESE, S. - JEFFREY, J.J. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology*, 1995, vol. 136, no. 4, s. 1348-1354.
19. CANÇADO, R.D. - CHIATTONE, C.S. - ALONSO, F.F. - LANGHI, D.M. Jr - ALVES R.DE.C. Iron deficiency in blood donors. *Sao Paulo Medical Journal*, 2001, vol. 119, no. 4, s. 132-4.
20. CASTILLO, L. - DEROJAS, T.C. - CHAPMAN, T.E. - VOGT, J. - BURKE, J.F. - TANNENBAUM, S.R. - YOUNG, V.R. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, vol. 90, no. 1, s. 193-197.
21. CHEVALLEY, T. - HOFFMEYER, P. - BONJOUR, J.P. - RIZZOLI, R. Early serum IGF-I response to oral protein supplements in elderly women with a recent hip fracture. *Clinical Nutrition*, 2010, vol. 29, no. 1, s. 78-83.
22. CHILIBECK, P.D. - CHRUSCH, M.J. - CHAD, K.E. - SHAWN DAVISON, K. - BURKE, D.G. Creatine monohydrate and resistance training increase bone mineral content and density in older men. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2005, vol. 9, no. 5, s. 352-353.
23. CHOI, M.J. - CHANG, K.J. Effect of dietary taurine and arginine supplementation on bone mineral density in growing female rats. *Advance in Experimental Medicine and Biology*, 2013, vol 776, s. 335-345.

24. CHRUSCH, M.J. – CHILIBECK, P.D. – CHAD, K.E. – DAVISON, K.S. – BURKE, D.G. Creatine supplementation combined with resistance training in older men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2001, vol. 33, no. 12, s. 2111-2117.
25. CLEGG, A. – YOUNG, J. – ILIFFE, S. – RIKKERT, M.O. – ROCKWOOD, K. Frailty in elderly people. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9868, s. 752-62. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62167-9.
26. COMELEKOGLU, U. – MUTLU, H. – YALIN, S. – BAGIS, S. – YILDIZ, A. – OGENLER, O. Determining the biomechanical quality of normal and osteoporotic bones in rat femora through biomechanical test and finite element analysis. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 2007, vol. 41, no. 1, s. 53-57.
27. COMELEKOGLU, U. – MUTLU, H. – YALIN, S. – OGENLER, O. – YILDIZ, A. – SAHIN O.N. – OGUZ, I. – HATUNGIL, R. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clinical Rheumatology*, 2007, vol. 26, no. 3, s. 380-384.
28. CREPALDI, G. – MAGGI, S. Sarcopenia and osteoporosis: A hazardous duet. *Journal of endocrinological investigation*, 2005, vol. 28, no. 10 Suppl, s. 66-68.
29. da SILVA, D.V. – CONTE-JUNIOR, C.A. – PASCHOALIN, V.M. – ALVARESTDA, S. Hormonal response to L-arginine supplementation in physically active individuals. *Food & Nutrition Research*, 2014, vol. 25, no. 58, eCollection. [cit. 2014-09-28]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967014/>>. ISSN 1654-6628.
30. DARLING, A.L. – MILLWARD, D.J. – TORGERSON, D.J. – HEWITT, C.E. – LANHAM-NEW, S.A. Dietary protein and bone health: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 90, no. 6, s. 1674-1692.
31. de SOUZA, R.A. – XAVIER, M. – da SILVA, F.F. – de SOUZA, M.T. – TOSATO, M.G. – MARTIN, A.A. – CASTILHO, J.C. – RIBEIRO, W. – SILVEIRA Jr., L. Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. *Lasers in Medical Science*, 2012, vol. 27, no. 2, s. 487-495.
32. DESIDERI, E. – VEGLIANTE, R. – CARDACI, S. – NEPRAVISHTA, R. – PACI, M. – CIRIOLO, M.R. MAPK14/p38 $\alpha$ -dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation. *Autophagy*, 2014, vol. 10, no. 9, s. 1652-1665.
33. DEVLIN, M.J. Why does starvation make bones fat? *American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council*, 2011, vol. 23, no. 5, s. 577-585.
34. EIUNDE, B.O. – VAN LEEMPUTTE, M. – GORIS, M. – LABARQUE, V. – TAES, Y. – VERBESSEM, P. – VANHEES, L. – RAMAEKERS, M. – VANDEN EYNDE, B. – VAN SCHUYLENBERGH, R. – DOM, R. – RICHTER, E.A. – HESPEL, P. Effects of creatine supplementation and exercise training on fitness in men 55-75 year old. *Journal of Applied Physiology (Betheda, Md.:1985)*, 2003, vol. 95, no. 2, s. 818-828.
35. ELIOT, K.A. – KNEHANS, A.W. – BEMBEN, D.A. – WITTEN, M.S. – CARTER, J. – BEMBEN, M.G. The effects of creatine and whey protein supplementation on body composition in men aged 48 to 72 years during resistance training. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2008, vol. 12, no. 3, s. 208-212.
36. FAZELI, P.K. – BREDELLA, M.A. – MISRA, M. – MEENAGHAN, E. – ROSEN, C.J. – CLEMMONS, D.R. – BREGGIA, A. – MILLER, K.K. – KLIBANSKI, A. Preadipocyte factor-1 is associated with marrow adiposity and bone mineral density in women with anorexia nervosa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2010a, vol. 95, no. 1, s. 407-413.
37. FOUAD, A.M. – EL-SENOUSEY, H.K. – YANG, X.J. – YAO, J.H. Dietary L arginine supplementation reduces abdominal fat content by modulating lipid metabolism in broiler chickens. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 2013, vol. 7, no. 8, s. 1239-45.
38. FROST, H.M. Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *The Anatomical Record*, 1987, vol. 219, no. 1, s. 1-9.
39. FROST, H.M. Bone's mechanostat: a 2003 update. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 2003, vol. 275, no. 2, s. 1081-1101.
40. FUNANAGO, V.L. – CARANGO, P. – SHAPIRO, I.M. – TOKUOKA, T. – TUAN, R.S. Creatine kinase activity is required for mineral deposition and matrix synthesis in endochondral growth cartilage. *Bone and Mineral*, 1992, vol. 17, no. 2, s. 228-236.
41. GEINOZ, G. – RAPIN, C.H. – RIZZOLI, R. – KRAEMER, R. – BUCHS, B. – SLOSMAN, D. – MICHEL, J.P. – BONJOUR, J.P. Relationship between bone mineral density and dietary intakes in the elderly. *Osteoporosis International*. 1993, vol. 3, no. 5, s. 242-248.
42. GERBER, I. – GWYNN, I. – ALINI, M. – T. WALLIMANN, T. Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *European Cells & Materials*, 2005, vol. 15, no. 10, s. 8-22.
43. GIMBLE, J.M. – ROBINSON, C.E. – WU, X. – KELLY, K.A. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 1996, vol. 19, no. 5, s. 421-428.
44. GLEESON, M. Interrelationship between Physical Activity and Branched-Chain Amino Acids. *The Journal of Nutrition*, 2005, vol. 135, no. 6, s. 1591-1595.
45. GOTSHALK, L.A. – KRAEMER, W.J. – MENDONCA, M.A. – VINGREN, J.L. – KENNY, A.M. – SPIERING, B.A. – HATFIELD, D.L. – FRAGALA, M.S. – VOLEK, J.S. Creatine supplementation improves muscular performance in older women. *European Journal of Applied Physiology*, 2008, vol. 102, no. 2, s. 223-231.
46. GUGGENBUHL, P. – DEUGNIER, Y. – BOISDET, J.F. – ROLLAND, Y. – PERDRIGER, A. – PAWLOTSKY, Y. – CHALÈS, G. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporosis International*, 2005, vol. 16, no. 12, s. 1809-1814.
47. GUGGENBUHL, P. – FILMON, R. – MABILLEAU, G. – BASLÉ, M.F. – CHAPPARD, D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism*, 2008, vol. 57, no. 7, s. 903-910.

48. GUREVITCH, O. – KHITRIN, S. – VALITOV, A. – SLAVIN, S. Osteoporosis of hematologic etiology. *Experimental Hematology*, 2007, vol. 35, no. 1, s. 128–136.
49. HANNAN, M.T. – TUCKER, K.L. – DAWSON-HUGHES, B. – CUPPLES, L.A. – FELSON, D.T. – KIEL, D.P. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Bone Mineral Research*, 2000, vol. 15, no. 12, s. 2504–2512.
50. HARRIS, M.M. – HOUTKOOPER, L.B. – STANFORD, V.A. – PARKHILL, C. – WEBER, J.L. – FLINT-WAGNER, H. – WEISS, L. – GOING, S.B. – LOHMAN, T.G. Dietary Iron Is Associated with Bone Mineral Density in Healthy Postmenopausal Women. *The Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, no. 11, s. 3598–3602.
51. HERLIN, M. – KALANTARI, F. – STERN, N. – SAND, S. – LARSSON, S. – VILUKSELA, M. – TUOMISTO, J.T. – TUOMISTO, J. – TUUKKANEN, J. – JÄMSÄ, T. – LIND, P.M. – HÅKANSSON, H. 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, vol. 273, no. 1–3, s. 1–11.
52. HONG, J.H. – HWANG, E.S. – MCMANUS, M.T. – AMSTERDAM, A. – TIAN, Y. – KALMUKOVA, R. – MUELLER, E. – BENJAMIN, T. – SPIEGELMAN, B.M. – SHARP, P.A. – HOPKINS, N. – YAFFE, M.B. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 2005, vol. 309, no. 5737, s. 1074–1078.
53. HURSON, M. – REGAN, M. – KIRK, S. – WASSERKRUG, H. – BARBUL, A. Metabolic effects of arginine in a healthy elderly population. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1995, vol. 19, no. 3, s. 227–230.
54. IWAMOTO, J. – SEKI, A. – TAKEDA, T. – SATO, Y. – YAMADA, H. – YEH, J.K. Comparative therapeutic effects of alendronate and alfacalcidol on Cancellous and Cortical bone mass and mechanical properties in ovariectomized osteopenic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2006, vol. 52, no. 1, s. 1–8.
55. JÄRVINEN, T.L. – SIEVÄNEH, H. – KANNUS, P. – JÄRVINEN, M. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Predicting Mechanical Characteristics of Rat Femur. *Bone*, 1998, vol. 22, no. 5, s. 551–558.
56. JAVADZADEH SHAHSHAHANI, H. – ATTAR, M. – TAHER YAVARI, M. A study of the prevalence of iron deficiency and its related factors in blood donors of Yazd, Iran, 2003. *Transfusion Medicine*, 2005, vol. 15, no. 4, s. 287–293.
57. JIANG, G.Z. – MATSUMOTO, H. – HORI, M. – GUNJI, A. – HAKOZAKI, K. – AKIMOTO, Y. – FUJII, A. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2008, vol. 26, no. 2, s. 130–137.
58. KERSTETTER, J.E. – O'BRIEN, K.O. – INSOGNA, K.L. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *The Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, no. 3, s. 855S–861S.
59. KLEY, R.A. – TARNOPOLSKY, M.A. – VORGERD, M. Creatine for treating muscle disorders. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013, vol. 5, no. 6, CD004760.
60. KUDO, H. – SUZUKI, S. – WATANABE, A. – KIKUCHI, H. – SASSA, S. – SAKAMOTO, S. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*, 2008, vol. 246, no. 2–3, s. 143–147.
61. LEPOLA, V.T. – HANNUNIEMI, R. – KIPPO, K. – LAURIÄÄN, L. – JALOVAARA, P. – VÄÄNANEN, H.K. Long-Term Effects of Clodronate on Growing Rat Bone. *Bone*, 1996, vol. 18, no. 2, s. 191–196.
62. LEPPÄNEN, O. – SIEVÄNEN, H. – JOKIHAARA, J. – PAJAMÄKI, I. – JÄRVINEN, T.L. Three-Point Bending of Rat Femur in the Mediolateral Direction: Introduction and Validation of a Novel Biomechanical Testing Protocol. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, vol. 21, no. 8, s. 1231–1237.
63. LEPPÄNEN, O.V. – SIEVÄNEN, H. – JÄRVINEN, T.L. Biomechanical testing in experimental bone interventions—May the power be with you. *Journal of Biomechanics*, 2008, vol. 41, no. 8, s. 1623–1631.
64. LOUIS, M. – LEBACQ, J. – POORTMANS, J.R. – BELPAIRE-DETHIOU, M.C. – DEVOGELAER, J.P. – VAN HECKE, P. – GOUBEL, F. – FRANCAUX, M. Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve*, 2003, vol. 27, no. 5, s. 604–610.
65. LOUIS, M. – POORTMANS, J.R. – FRANCAUX, M. – BERRÉ, J. – BOISSEAU, N. – BRASSINE, E. – CUTHBERTSON, D.J. – SMITH, K. – BABRAJ, J.A. – WADDELL, T. – RENNIE, M.J. No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2003, vol. 285, no. 5, s. E1089–1094.
66. MARDON, J. – HABAUZIT, V. – TRZECIAKIEWICZ, A. – DAVICCO, M.J. – LEBECQUE, P. – MERCIER, S. – TRESSOL, J.C. – HORCAJADA, M.N. – DEMIGNE, C. – COXAM, V. Long-term intake of a high-protein diet with or without potassium citrate modulates acid-base metabolism, but not bone status, in male rats. *The Journal of Nutrition*, 2008, vol. 138, no. 4, s. 718–724.
67. MARDON, J. – TRZECIAKIEWICZ, A. – HABAUZIT, V. – DAVICCO, M.J. – LEBECQUE, P. – MERCIER, S. – TRESSOL, J.C. – HORCAJADA, M.N. – DEMIGNÉ, C. – COXAM, V. Dietary protein supplementation increases peak bone mass acquisition in energy-restricted growing rats. *Pediatric Research*, 2009, vol. 66, no. 5, s. 513–518.
68. MARDON, J. – ZANGARELLI, A. – WALRAND, S. – DAVICCO, M.J. – LEBECQUE, P. – DEMIGNE, C. – HORCAJADA, M.N. – BOIRIE, Y. – COXAM, V. Impact of energy and casein or whey protein intake on bone status in a rat model of age-related bone loss. *The British Journal of Nutrition*, 2008, vol. 99, no. 4, s. 764–772.
69. MASSEY, L.K. Dietary animal and plant protein and human bone health: a whole foods approach. *The Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, no. 3, s. 862S–865S.
70. MATSHUSHIMA, S. – HOSHIMOTO, M. – TORII, M. – OZAKI, K. – NARAMA, I. Iron Lactate-Induced Osteopenia in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicology Pathology*, 2001, vol. 29, no. 6, s. 623–629.
71. MATSHUSHIMA, S. – TORII, M. – OZAKI, K. – NARAMA, I. Iron Lactate-Induced Osteomalacia in Association with Osteoblast Dynamics. *Toxicologic Pathology*, 2003, vol. 31, no. 6, s. 646–654.

72. McCUE M.D. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 2010, vol. 156, no. 1, s. 1-18.
73. MERRY, A.H. – HARWOOD, R. – WOOLEY, D.E. – GRANT, M.E. – JACKSON, D.S. Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxy-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, vol. 71, no. 1, s. 83–90.
74. MOCHIZUKI, H. – HAKEDA, Y. – WAKATSUKI, N. – USUI, N. – AKASHI, S. – SATO, T. – TANAKA, K. – KUMEGAWA, M. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology*, 1992, vol. 131, no. 3, s. 1075–1080.
75. MORA LDE, O. – ANTUNES, L.M. – FRANCESCATO, H.D. – BIANCHI, M.L. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research*, 2002, vol. 518, no. 1, s. 65–70.
76. MORO-ALVAREZ, M.J. – DÍAZ CURIEL, M. - de la PIEDRA, C. – MARIÑOSO, M.L. – CARRASCAL, M.T. Bone Disease Induced by Phenytoin Therapy: Clinical and Experimental Study. *European Neurology*, 2009, vol. 62, no. 4, s. 219–230.
77. MURUGANANDAN, S. – ROMAN, A.A. – SINAL, C.J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cellular and Molecular Life Science*, 2009, vol. 66, no. 2, s. 236–253.
78. NEWSHOLME, E. – HARDY, G. Supplementation of Diets with Nutritional Pharmaceuticals. *Nutrition*, 1997, vol. 13, no. 9, s. 837-839.
79. NUTTALL, M.E. – GIMBLE, J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Current Opinion in Pharmacology*, 2004, vol. 4, no. 3, s. 290–294.
80. OBEID, O.A. – BITTAR, S.T. – HWALLA, N. – EMERY, P.W. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. *Nutrition*, 2005, vol. 21, no. 2, s. 224-229.
81. POTTS, J.T. Parathyroid hormone: past and present. *Journal of Endocrinology*, 2005, vol. 187, no. 3, s. 311–325.
82. RACEK, Jaroslav: *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9. Kapitola 21, Laboratorní ukazatele kostního metabolismu, s. 191-195.
83. RAE, C. – DIGNEY, A.L. – McEWAN, S.R. – BATES, T.C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proceedings. Biological Science*. 2003, vol. 270, no. 1529, s. 2147-2150.
84. RAWSON, E.S. – CLARKSON, P.M. Acute creatine supplementation in older men. *International Journal of Sports and Medicine*, 2000, vol. 21, no. 1, s. 71-75.
85. RAWSON, E.S. – WEHNERT, M.L. – CLARKSON, P.M. Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 1999, vol. 80, no. 2, s. 139-144.
86. RØSVIK, A.S. – HERVIG, T. - WENTZEL-LARSEN, T. – ULVIK, R.J. Effect of iron supplementation on iron status during the first week after blood donation. *Vox Sanguinis*, 2010, vol. 98, no. 3, s. 249-256.
87. SCHERZ-SHOVAL, R. – SHVETS, E. – FASS, E. – SHORER, H. – GIL, L. – ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 2007, vol. 26, no. 7, s. 1749-1760.
88. SCHÜRCH, M.A. – RIZZOLI, R. - SLOSMAN, D. – VADAS, L. – VERGNAUD, P. – BONJOUR, J.P. Protein Supplements Increase Serum Insulin-Like Growth Factor-I Levels and Attenuate Proximal Femur Bone Loss in Patients with Recent Hip Fracture A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Annals of Internal Medicine*, 1998, vol. 128, no. 10, s. 801-809.
89. SCOTECE, M. – CONDE, J. – ABELLA, V. – LÓPEZ, V. – PINO, J. – LAGO, F. - GÓMEZ-REINO, J.J. – GUALILLO, O. Bone metabolism and adipokines: are there perspectives for bone diseases drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2014, vol. 9, no. 8, s. 945-957.
90. SEIBEL, M.J. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *The Clinical Biochemist. Reviews*. 2005, vol. 26, no. 4, s. 97-122.
91. SELLMEYER, D.E. – STONE, K.L. – SEBASTIAN, A. – CUMMINGS, S.R. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, vol. 73, no. 1, s. 118–122.
92. SHIMOMURA, Y. – YAMAMOTO, Y. – BAJOTTO, G. – SATO, J. – MURAKAMI, T. – SHIMOMURA, N. – KOBAYASHIAND, H. – MAWATARI, K. Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *The Journal of Nutrition*, 2006, vol. 136, no. 2, s. 529-532.
93. STOUT, J.R. - SUE GRAVES, B. – CRAMER, J.T. – GOLDSTEIN, E.R. – COSTA, P.B. – SMITH, A.E. – WALTER, A.A. Effects of creatine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue threshold and muscle strength in elderly men and women (64 - 86 years). *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2007, vol. 11, no. 6, s. 459-464.
94. STÜRMER, E.K. - SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. – SEHMISCH, S. – RACK, T. – WILLE, J. – FROSCH, K.H. – WUTTKE, W. – STÜRMER, K.M. Standardized Bending and Breaking Test for the Normal and Osteoporotic Metaphyseal Tibias of the Rat: Effect of Estradiol, Testosterone, and Raloxifene. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, vol. 21, no. 1, s. 89-96.
95. TALBOTT, S.M. – CICUENTES, M. – DUNN, M.G. – SHAPSES, S.A. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. *The Journal of Nutrition*, 2001, vol. 131, no. 9, s. 2382–2387.
96. TARNOPOLSKY, M.A. – MAHONEY, D.J. – VAJSAR, J. – RODRIGUEZ, C. – DOHERTY, T.J. – ROY, B.D. – BIGGAR, D. Creatine monohydrate enhances strength and body composition in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 2004, vol. 62, no. 10, s. 1771-1777.

97. TATARA, M.R. – BRODZKI, A. – KRUPSKI, W. – SLIWA, E. – SILMANOWICZ, P. – MAJCHER, P. – PIERZYNOWSKI, S.G. – STUDZIŃSKI, T. Effect of  $\alpha$  Ketoglutarate on Bone Homeostasis and Plasma Amino Acids in Turkeys. *Poultry Science*, 2005, vol. 84, no. 10, s. 1604-1609.
98. TATARA, M.R. – PIERZYNOWSKI, S.G. – MAJCHER, P. – KRUPSKI, W. – BRODZKI, A. – STUDZINSKI, T. Effect of alphasketoglutarate (AKG) on mineralisation, morphology and mechanical endurance of femur and tibia in turkey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2004, vol. 48, no. 3, s. 305–309.
99. TATARA, M.R. – TYGESEN, M.P. - SAWA-WOJTANOWICZ, B. – KRUPSKI, W. – MAJCHER, P. – HARRISON, A.P. Bone development: the effect of short-term alpha-ketoglutarate administration on long-term mechanical properties of ribs in ram lambs. *Small Ruminant Research*, 2007, vol. 67, no. 2-3, s. 179– 183.
100. TURNER, C.H. – BURR, D.B.: Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial. *Bone*, 1993, vol.14, no.4, s. 595-608.
101. VALENTI, L. – VARENNA, M. – FRACANZANI, A.L. – ROSSI, V. – FARGION, S. – SINIGAGLIA, L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporosis International*, 2009, vol. 20, no. 4, s. 549–555.
102. VEAL, E.A. – DAY, A.M. – MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 2007, vol. 26, no. 1, s. 1-14.
103. VERNEJOU de, M.C. – POINTILLART, A. – GOLENZER, C.C. – MORIEUX, C. – BIELAKOFF, J. – MODROWSKI, D. – MIRAVET, L. Effect of iron loading on bone remodeling in pigs. *The American Journal of Pathology*, 1984, vol. 116, no. 3, s. 377-384.
104. VYSKOČIL, Václav. *Osteoporóza a ostatní nejčastější metabolická onemocnění skeletu*. Praha: Galén, 2009. 507 s. ISBN 978-80-7262-637-3. Kapitola 2.3, Kostní buňky, s. 19-21. Kapitola 2.4, Jednotky kostní remodelace, s. 21-22. Kapitola 6.5.1, Markery kostní formace, s. 95-98. Kapitola 9.8, Ideální hmotnost, s. 146.
105. WALLIMANN, T. - TOKARSKA-SCHLATTNER, M. – SCHLATTNER, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011, vol. 40, no. 5, s. 1271-1296.
106. WEINBERG, E.D. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *BioMetals*, 2006, vol. 19, no. 6, s. 633-635.
107. WEINBERG, E.D. Role of iron in osteoporosis. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 2008, vol. 6, suppl. 1, s. 81-85.
108. WEISS, R.E. – GORN, A. – DUX, S. – NIMNI, M.E. Influence of high protein diets on cartilage and bone formation in rats. *The Journal of Nutrition*. 1981, vol. 111, no. 5, s. 804–16.
109. WIMALAWANSA, S.J. – CHAPA, M.T. – YALLAMPALLI, C. - ZHANG, R. – SIMMONS, D.J. Prevention of corticosteroid-induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone*, 1997, vol. 21, no. 3, s. 275–280.
110. ZHANG, Y. – XIE, Y. – BERGLUND, E.D. – COATE, K.C. – HE, T.T. - KATAFUCHI, T. – XIAO, G. – POTTHOFF, M.J. – WEI, W. – WAN, Y. – YU, R.T. – EVANS, R.M. – KLIEWER, S.A. – MANGELSDORF, D.J. The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife*, 2012, vol. 15, no. 1.
111. ZHOU, J. – KEENAN, M.J. – LOSSO, J.N. – RAGGIO, A.M. – SHEN, L. – McCUTCHEON, K.L. – TULLEY, R.T. – BLACKMAN, M.R. – MARTIN, R.J. Dietary whey protein decreases food intake and body fat in rats. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, vol. 19, no. 8, s. 1568-1573.
112. ZIEGLER, T.R. Glutamine supplementation in bone marrow transplantation. *The British Journal of Nutrition*, 2002, vol. 87, Suppl. 1, s. 9–15.

## 10. Přehled přednáškové a publikační činnosti

### 10.1 Původní vědecké práce s impakt faktorem

1. Gradosova, I. – Zivna, H. – Palicka, V. – Hubena, S. – Svejkovska, K. – Zivny, P. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 2012, vol. 679, no. 1-3, s. 144-150 [IF 2,737].
2. Gradosova, I. – Zivna, H. – Palicka, V. – Hubena, S. – Svejkovska, K. – Zivny, P. Protective effect of amlodipine on rat bone tissue after orchidectomy. *Pharmacology*, 2012, vol. 89, no. 1-2, s. 37-43 [IF 1,918].
3. Gradosova, I. – Zivna, H. – Svejkovska, K. – Palicka, V. – Tichy, A. – Zivny, P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie*, 2011, vol. 66, no. 8, s. 606-610 [IF 0,81].
4. Gradosova, I. – Zivna, H. – Svejkovska, K. – Palicka, V. – Tichy, A. – Zivny, P. Effects of amlodipine on bone metabolism in male albino Wistar rats. *Acta Veterinaria Brno*, 2011, vol. 80, no. 4, s. 391-396 [IF 0,534].
5. Zivna, H. - Zivny, P. - Vokurkova, D. - Svejkovska, K. – Palicka, V. The effect of chronic iron losses on liver regeneration in male and female rats. *Biomed Pap med Fac Univ Palacky Olomouc*, 2010, 154(2):153-158, ISSN 1213-8118 [IF 0,716]

### 10.2 Ostatní publikace v časopise s IF

### 10.3 Původní publikace bez impakt faktoru v recenzovaných časopisech

1. Švejkovská, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Doubková, K. – Živný, P. – Čermáková, E. – Palička, V. Vliv opakovaných odběrů krve a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 142-148.
2. Josefová, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Doubková, K. – Holeček, M – Živný, P. Palička, V. Vliv vysokoproteinové diety se zvýšeným obsahem glutaminu na metabolismus kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2010, roč. 15, č. 1, s. 3-8.
1. Švejkovská K., Doubková K., Živná H., Živný P., Palička V.: Ovlivnění metabolismu kostí u potkanů opakovanými krevními odběry a dietou obohacenou o železo; *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2009, vol. 17, no. 38, 2009, p. 146–151.
2. Doubková, K. – Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Živný, P. – Živná, H. – Čermáková, E. – Palička, V. Vliv jaterní regenerace na metabolismus kostí dospělých samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický bulletin*. 2013, roč. 18, č. 2, s. 48-52.
3. Zivna, H. – Maric, L. – Gradosova, I. – Svejkovska, K. – Hubena, S. – Palicka, V. – Zivny, P. The effect of mud-bath therapy on bone status in rats during adjuvant subchronic arthritis. *Acta Medica*, 2012, vol. 55, no. 3, s. 133-137.
4. Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Živná, H. – Živný, P. – Čermáková, E. – Tichý, A. – Palička, V. Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 1, s. 3-7.
5. Gradošová, I. – Živná, H. – Živný, P. – Hubená, S. – Švejkovská, K. – Palička, V. Vliv metoprololu na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar po provedené orchidektomii. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, s. 4, s. 153-158.
6. Živná, H. – Živný, P. – Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Hubená, S. – Živný, O. – Palička, V. Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 137-141.
7. Živný, P. – Živná, H. – Gradošová, I. – Švejkovská, K. – Hubená, S. – Palička, V. Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 149-153.

8. Gradošová, I. – Josefová, K. – Živná, H. – Živný, P. – Palička, V. Vliv ezetimibu na kostní metabolismus u potkanů. *Osteologický Bulletin*, 2009, roč.14, č. 4, s. 156-160.

#### 10.4 Monografie

#### 10.5 Ostatní publikace v časopise bez IF

Živný, P. – Švejková, K. – Gradošová, I. – Živná, H. – Palička, V. Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu - souhrn poznatků. *Osteologický Bulletin*, 2011, roč. 16, č. 4, s. 131-136.

#### 10.6 Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

1. Švejková, K. – Živná, H. – Gradošová, I. – Živný, P. – Palička, V. Vliv diety obohacené o aminokyseliny na mechanické vlastnosti kostí potkanů. XVI. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, Olomouc, ČR, 12.-14.9.2013. Abstrakt uveřejněn v: *Osteologický bulletin*. 2013, roč. 18, č. 3, s. 120-121.
2. Svejkovska, K. – Gradosova, I. - Zivna, H. - Holecek, M. - Doubkova, K. - Zivny, P. – Palicka, V. Effect of amino acids enriched diet on bone metabolism in rats. 15. Konference o laboratorních zvířatech, Tišnov, ČR, 23.-25.5.2012. Abstrakt uveřejněn v: *Physiological research*. 2013, roč. 62, č. 1, s. 6P.
3. Svejkovska, K. – Gradosova, I. - Doubkova, K. -Zivna, H. - Zivny, P. – Palicka V. Bone metabolism, blood withdrawals and iron enriched diet in rats. 15. Konference o laboratorních zvířatech, Tišnov, ČR, 23.-25.5.2012. Abstrakt uveřejněn v: *Physiological research*. 2013, roč. 62, č. 1, s. 6P.
4. Švejková, K. – Živná, H. – Gradošová, I. – Doubková, K. – Živný, P. – Palička, V. Vliv diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí potkanů. X. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie ČLS JEP s mezinárodní účastí, Plzeň, ČR, 25.–27.9.2011. Abstrakt uveřejněn v: *Klinická biochemie a metabolismus*, 2011, vol 3, s. 207.
5. Švejková, K. – Živná, H. – Gradošová, I. – Doubková, K. – Živný, P. – Palička, V. Vliv opakovaných krevních odběrů a diety obohacené o železo na mechanické vlastnosti kostí. XIV. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, Hradec Králové, ČR, 8.-10.9.2011. Přednáška. Abstrakt uveřejněn v: *Osteologický Bulletin*. 2011, vol. 16, no. 3, s. 121-122.
6. Josefova, K. - Gradosova, I. - Doubkova, K. - Zivna, H. - Zivny, P. – Palicka, V. The bone metabolism, repeated blood withdrawals and iron enriched diet in rats. 37th European Symposium on Calcified Tissues, Glasgow, Scotland, 26.-30.6.2010. Abstrakt uveřejněn v: *Bone*, 2010, vol. 47, Suppl. 1, S85.
7. Josefova, K. - Gradosova, I. - Zivna, H. - Doubkova, K. - Holecek, M. - Zivny, P. – Palicka, V. Dietary protein and bone metabolism in rats. IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (IOF WCO-ECCEO10), Florencie, Italy, 5.-8.5.2010. Abstrakt uveřejněn v: *Osteoporosis International*, 2010, vol. 21, Suppl.1, S213.
8. Svejkovska K., Doubkova K., Zivna H., Zivny P. Iron enriched diet, repeated blood withdrawals and their effect on bone metabolism in rats. ECTS2009, 36th European Symposium on Calcified Tissues, Vienna, Austria, 23.-27.5.2009. Abstrakt uveřejněn v: *Bone*, 2009, vol. 44, Suppl. 2, S382.
9. Švejková, K. Fakultní konference studentů DS 2. ročníku, 10/2008, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem Change of bone metabolism by blood withdrawals and iron diet in rats.
10. Svejkovska, K. – Doubkova, K. – Zivna, H. – Zivny, P. The effect of blood withdrawals and iron diet on bone metabolism in rats; 20th International congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Fortaleza, Brazil, 28.9.–2.10.2008. Přednáška. Abstrakt uveřejněn v: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, vol. 46, S1.