

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Klinická biochemie

Vliv výživy na metabolismus kostí

The effect of nutrition on bone metabolism

Mgr. Klára Švejkovská

Školitel: doc. MUDr. Helena Živná, CSc.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.

Hradec Králové, 2015

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Praha, 27. 3. 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. MUDr. Heleně Živné, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, vstřícnost a trpělivost při zpracování disertační práce.

Mé díky patří také panu doc. MUDr. Pavlovi Živnému, CSc. za cenné rady, připomínky a panu prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h. c. za podporu v době studia. Dále bych ráda poděkovala Dagmar Ježkové a Kateřině Šildbergerové za pomoc při práci s laboratorními zvířaty a RNDr. Evě Čermákové děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Poděkování patří také prof. MUDr. Milanovi Holečkovi, DrSc. za poskytnutí biologického materiálu.

Velké poděkování patří mým rodičům a přítelovi Kamilovi za podporu v době studia a především v době sepisování této práce.

Tato disertační práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem a granty:

MZO 00179906

MSM 0021620820

SVV-2010-62051

SVV-2011-262902

SVV-2012-264902

SVV-2013-266902

PRVOUK 37/11

PRVOUK 37/05

Obsah

1. Úvod do problematiky.....	19
1.1 Kost.....	19
1.2 Vyšetřovací metody	23
1.3 Biomechanické testování	26
1.4 Biochemické metody	31
1.4.1 Kostní izoforma alkalické fosfatázy	32
1.4.2 Osteokalcin	33
1.4.3 Kolagen I	35
1.4.4 Amino-terminální propeptid prokolagenu I (PINP).....	35
1.4.5 Karboxy-terminální propeptid prokolagenu typu I (PICP).....	36
1.4.6 N-terminální a C-terminální telopeptidy kolagenu typu I (CTX-I, NTX-I)	36
1.4.7 Inzulinu podobný růstový faktor (IGF-I).....	37
1.4.8 Kostní morfogenetické proteiny (BMPs).....	38
1.5 Aminokyseliny.....	38
1.5.1 Glutamin	38
1.5.2 Arginin.....	40
1.5.3 Kreatin	42
1.5.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem.....	43
1.5.5 Kasein	45
1.6 Nedostatek nebo nadbytek proteinů v potravě.....	46
1.7 Hladovění.....	47
1.8 Železo	49
2. Cíle disertační práce.....	51
3. Experimentální část.....	53
3.1 Experiment s podáváním aminokyselin a bílkoviny	53
3.1.1 Experimentální dieta.....	53
3.1.2 Experimentální zvířata.....	54
3.1.3 Experiment s dietou obohacenou o aminokyseliny a o bílkovinu	54
3.1.4 Experiment s dietou obohacenou o arginin.....	55
3.1.5 Experiment s dietou obohacenou o kreatin.....	55
3.1.6 Experiment s dlouhodobým omezením příjmu potravy - párové krmení	55
3.1.7 Experiment s krátkodobým hladověním	56
3.2 Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve.....	56
3.2.1 Experimentální dieta.....	56
3.2.2 Experimentální zvířata.....	57

3.3	Materiál a metody	58
3.3.1	Příprava vzorků.....	58
3.3.2	Homogenizace	59
3.3.3	Biochemická analýza	59
3.3.4	Denzitometrické vyšetření	61
3.3.5	Testování mechanické odolnosti kostní tkáně	62
3.3.6	Statistická analýza a zpracování dat	67
4.	Výsledky	69
4.1	Validace přesnosti přístroje	69
4.2	Vliv diety obohacené o glutamin	69
4.3	Vliv diety obohacené o arginin	73
4.4	Vliv diety obohacené o kreatin	77
4.5	Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny	81
4.6	Vliv diety obohacené o kasein	84
4.7	Vliv realimentace SLD	87
4.7.1	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein	87
4.7.2	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny	90
4.7.3	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin	92
4.8	Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – párové krmení	94
4.8.1	Párové krmení standardní laboratorní dietou.....	94
4.8.2	Párové krmení dietou obohacenou o kasein	99
4.9	Vliv krátkodobého hladovění.....	103
4.9.1	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety.....	103
4.9.2	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin.....	107
4.9.3	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin.....	110
4.10	Vliv železa a opakovaných odběrů krve	113
4.10.1	Vliv nadbytku železa v dietě.....	113
4.10.2	Vliv opakovaných odběrů krve u jednotlivých typů diet.....	116
5.	Diskuse.....	120
5.1	Vliv diety obohacené o glutamin na metabolismus kostí	120
5.2	Vliv diety obohacené o arginin na metabolismus kostí.....	121
5.3	Vliv diety obohacené o kreatin na metabolismus kostí	123
5.4	Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny na metabolismus kostí.....	125
5.5	Vliv diety obohacené o kasein na metabolismus kostí	127
5.6	Vliv realimentace SLD na metabolismus kostí.....	130
5.6.1	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein	130

5.6.2	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny	131
5.6.3	Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin	131
5.7	Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – vliv párového krmení na metabolismus kostí.....	131
5.8	Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostí	134
5.8.1	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety.....	134
5.8.2	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin	135
5.8.3	Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin	136
5.9	Vliv železa a opakovaných odběrů krve na metabolismus kostí	137
5.9.1	Vliv nadbytku železa v dietě.....	137
5.9.2	Vliv nadbytku železa v dietě a opakovaných odběrů krve	138
6.	Závěr.....	141
7.	Souhrn	145
8.	Summary	148
9.	Literatura	151

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Validace přesnosti přístroje - Lámání skleněných tyček	69
Tabulka 2: Vliv glutaminu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.	70
Tabulka 3: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.....	70
Tabulka 4: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.....	70
Tabulka 5: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně (pravý versus levý femur).	71
Tabulka 6: Vliv glutaminu na kostní minerální hustotu.	73
Tabulka 7: Vliv argininu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.	74
Tabulka 8: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.....	74
Tabulka 9: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.....	74
Tabulka 10: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.	75
Tabulka 11: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie	75
Tabulka 12: Vliv argininu na kostní minerální hustotu.	77
Tabulka 13: Vliv argininu na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na obsah tuku v organismu.....	77
Tabulka 14: Vliv kreatinu na tělesnou hmotnost zvířat v průběhu pokusu a průměrná spotřeba diety.....	78
Tabulka 15: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.....	78
Tabulka 16: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.....	78
Tabulka 17: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.	79

Tabulka 18: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.	79
Tabulka 19: Vliv kreatinu na kostní minerální hustotu.	81
Tabulka 20: Vliv kreatinu na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na procentuální obsah tuku.	81
Tabulka 21: Vliv BCAA na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.	82
Tabulka 22: Vliv BCAA na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	82
Tabulka 23: Vliv BCAA na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	82
Tabulka 24: Vliv BCAA na koncentrace kostních markerů v séru.	83
Tabulka 25: Vliv BCAA na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.	83
Tabulka 26: Vliv kaseinu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety	85
Tabulka 27: Vliv kaseinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	85
Tabulka 28: Vliv kaseinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	85
Tabulka 29: Vliv kaseinu na koncentrace kostních markerů v séru.	86
Tabulka 30: Vliv kaseinu na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu. ...	86
Tabulka 31: Vliv kaseinu na kostní minerální hustotu.	87
Tabulka 32: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	87
Tabulka 33: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	87
Tabulka 34: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na koncentrace kostních markerů v séru a v kostním homogenátu.	89
Tabulka 35: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na kostní minerální hustotu.	89
Tabulka 36: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	90
Tabulka 37: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	90

Tabulka 38: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na koncentraci kostních markerů v séru a v kostním homogenátu.	91
Tabulka 39: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.	92
Tabulka 40: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	92
Tabulka 41: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	92
Tabulka 42: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na koncentrace kostních markerů v séru.	93
Tabulka 43: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.	93
Tabulka 44: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.	94
Tabulka 45: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	94
Tabulka 46: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	95
Tabulka 47: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.	95
Tabulka 48: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na kostní minerální hustotu.	96
Tabulka 49: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	97
Tabulka 50: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	97
Tabulka 51: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.	97
Tabulka 52: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na kostní minerální hustotu.	98
Tabulka 53: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	99
Tabulka 54: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	100

Tabulka 55: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.	100
Tabulka 56: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.	100
Tabulka 57: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti levého femuru.	101
Tabulka 58: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	101
Tabulka 59: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.	102
Tabulka 60: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat.	103
Tabulka 61: Vliv hladovění u skupiny ST1 na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.	104
Tabulka 62: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	104
Tabulka 63: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	104
Tabulka 64: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.	105
Tabulka 65: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.	105
Tabulka 66: Vliv hladovění u skupiny ST1 na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.	106
Tabulka 67: Vliv hladovění u skupiny ST1 na kostní minerální hustotu.	106
Tabulka 68: Vliv hladovění u skupiny ST1 na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na obsah tuku.	106
Tabulka 69: Vliv hladovění u skupiny Arg na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.	107
Tabulka 70: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.	107
Tabulka 71: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.	107

Tabulka 72: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.....	108
Tabulka 73: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.....	108
Tabulka 74: Vliv hladovění u skupiny Arg na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.....	109
Tabulka 75: Vliv hladovění u skupiny Arg na kostní minerální hustotu.....	109
Tabulka 76: Vliv hladovění u skupiny Arg na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a tělesný tuk.....	109
Tabulka 77: Vliv hladovění u skupiny Krea na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.....	110
Tabulka 78: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.....	110
Tabulka 79: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.....	111
Tabulka 80: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.....	111
Tabulka 81: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.....	112
Tabulka 82: Vliv hladovění u skupiny Krea na koncentrace kostních markerů v homogenátu kosti.....	112
Tabulka 83: Vliv hladovění u skupiny Krea na kostní minerální hustotu.....	113
Tabulka 84: Vliv hladovění u skupiny Krea na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a obsah tuku.....	113
Tabulka 85: Vliv železa na počty krevních buněk a koncentraci hemoglobinu.....	113
Tabulka 86: Vliv železa na koncentraci feritinu a železa v séru.....	114
Tabulka 87: Vliv železa na kostní minerální hustotu a hmotnost zvířat na konci pokusu.....	115
Tabulka 88: Vliv železa na mechanické vlastnosti kostní tkáně levého a pravého femuru.....	115
Tabulka 89: Vliv železa na koncentraci kostních markerů v séru.....	115
Tabulka 90: Vliv opakovaných krevních odběrů na počty krevních buněk a koncentraci hemoglobinu.....	116

Tabulka 91: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentraci feritinu v séru a obsah vápníku v kosti.....	117
Tabulka 92: Vliv opakovaných krevních odběrů na kostní minerální hustotu a na tělesnou hmotnost zvířat na konci pokusu.	118
Tabulka 93: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentrace kostních markerů v séru.....	118
Tabulka 94: Vliv opakovaných krevních odběrů na mechanické vlastnosti kostní tkáň levého a pravého femuru.....	119

Seznam grafů:

Graf 1: Vliv glutaminu na koncentraci kostním markerů v séru a v kostním homogenátu	72
Graf 2: Vliv glutaminu na tělesnou hmotnost zvířat a na procentuální obsah tukové tkáně.....	73
Graf 3: Vliv argininu na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.....	76
Graf 4: Vliv kreatinu na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.....	80
Graf 5: Vliv BCAA na kostní minerální hustotu a procentuální obsah tukové tkáně. ...	84
Graf 6: Vliv kaseinu na hmotnost zvířat a procentuální obsah tělesného tuku na konci pokusu.....	86
Graf 7: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na koncentraci CTX-I a PINP v séru a kostním homogenátu.	88
Graf 8: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na tělesnou hmotnost a na procentuální obsah tělesného tuku na konci pokusu.....	89
Graf 9: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na koncentraci BALP a CTX-I v kostním homogenátu:.....	91
Graf 10: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat:	96
Graf 11: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat.	98
Graf 12: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na odolnost krčku femuru v tlaku:	99
Graf 13: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na BMD v oblasti bederních, ocasních obratlů a v oblasti femuru.	102
Graf 14: Vliv železa na obsah železa a vápníku v kosti.	114
Graf 15: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentraci železa v séru a obsah železa v kosti.....	117

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Chemický strukturní vzorec glutaminu	38
Obrázek 2: Chemický strukturní vzorec argininu	40
Obrázek 3: Chemický strukturní vzorec kreatinu	42
Obrázek 4: Chemický strukturní vzorec valinu, leucinu a izoleucinu	43
Obrázek 5: Chemický strukturní vzorec kaseinu	45
Obrázek 6: Poloha potkan v průběhu měření kostní minerální hustoty (BMD).	61
Obrázek 7: Sken potkana se zvýrazněnými oblastmi hodnocení kostní minerální hustoty (BMD).	61
Obrázek 8: „Na zakázku“ vyrobený přístroj pro testování mechanických vlastností kostí tříbodovým ohýbáním a odolnosti v tlaku.	62
Obrázek 9: „Na zakázku“ vyrobený přístroj pro testování odolnosti kostí v torzi.	63
Obrázek 10: Testování mechanické odolnosti femuru při tříbodovém ohýbání.....	65
Obrázek 11: Testování odolnosti v torzi.....	66
Obrázek 12: Testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku.	67

Seznam zkratek:

AKG	alfa-ketoglutarát
ALP	alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
ALT	alaninaminotransferáza
AMP	adenosinmonofosfát
AP	anteroposteriorní
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	arginin
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
bALP	kostní izoforma alkalické fosfatázy (bone alkalie phosphatase)
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched-chain amino acids)
BCKA	ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched-chain ketoacids)
BMC	obsah minerálu v kosti (bone mineral content)
BMD	minerální hustota kosti (bone mineral density)
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CoA	koenzym A (coenzyme A)
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
CTX-I	karboxy-terminální telopeptid kolagenu I (carboxy-terminal telopeptide of type I collagen)
DPA	dvojfotonová absorpciometrie (dual photon absorptiometry)
DPD	deoxyypyridinolin
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (dual energy X-ray absorptiometry)
ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
Fe	železo
FGF21	fibroblastový růstový faktor 21 (Fibroblast growth factor-21)
FN	Fakultní nemocnice
GLN	glutamin
GMT	gamma-glutamyltransferáza
GPI	glykosylfosfatidylinositol

HHE	hereditární hemochromatóza
HK	Hradec Králové
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA
hr-pQCT	vysokorozlišovací periferní kvantitativní počítačová tomografie (high resolution peripheral quantitative computer tomography)
IGFBPs	proteiny vázající IGF (IGF binding proteins)
IGF-I	inzulinu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor I)
IL	interleukin
INF- γ	interferon γ
KAS	kasein
KO	kontrolní skupina zvířat
Krea	kreatin
LFUK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
M-CSF	monocyto-makrofágový faktor stimulující kolonie (macrophage colony-stimulating factor)
mikro-MRI	mikro-magnetická rezonance (micro magnetic resonance imaging)
ML	mediolaterální
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NCSS	Number Cruncher Statistical System
NF- κ B	nukleární faktor kappa-B (nuclear factor kappa-B)
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza NO
NTX-I	amino-terminální telopeptid kolagenu I (amino-terminal telopeptide of type I collagen)
OC	osteokalcin (osteocalcin)
OPG	osteoprotegerin
PBM	maximum kostní hmoty (peak bone mass)
Pi	anorganický fosfát
PICP	karboxy-terminální propeptid prokolagenu typu I (carboxy-terminal propeptide of type I collagen)
PINP	amino-terminální propeptid prokolagenu typu I (amino-terminal propeptide of type I collagen)
PKG	proteinkináza G

PPAR	receptor aktivovaný proliferáty peroxizomů (peroxisome proliferator-activator receptor)
Ppi	anorganický difosfát
pQCT	periferní kvantitativní počítačová tomografie (peripheral quantitative computer tomography)
PTH	parathyroidní hormon, parathormon
PYD	pyridinolin
RANK	aktivátor receptoru NF- κ B
RANKL	ligand pro aktivátor receptoru pro NF- κ B
RIL a VIV	Radioizotopové laboratoře a Vivárium
ROS	reaktivní kyslíkové druhy (reactive oxygen species)
rtg	rentgen
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SLD	standardní laboratorní dieta (standard laboratory diet)
SPA	jednofotonová absorpciometrie (single photon absorptiometry)
SPF	Specific Pathogen Free
TGF- β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
TNALP	tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TPB	tříbodové ohýbání (three-point bending)
TRACP	tartát rezistentní kyselá fosfatáza (tartar resistant acid phosphatase)
ucOC	karboxylovaný osteokalcin (undercarboxylated osteocalcin)
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
w	odběr krve (blood withdrawal)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1. Úvod do problematiky

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

Mechanické podněty působící na kost jsou poměrně 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 trámců, jejich orientace, tloušťka a tím se zvyšuje či snižuje odolnost kosti vůči zlomenině.

Chemickými podněty ovlivňujícími funkci kostních buněk a tím i stav kostní hmoty 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. Výživa organismu je proces, kterým získáváme základní živiny z vnějšího prostředí. Vlivu výživy na lidské zdraví se zabývalo již nespočetně studií. Je obecně známo, že nadbytek či nedostatek jedné či více základních složek potravy, má negativní vliv na celkový zdravotní stav organismu. Otázkou však zůstává, jak velký je vliv ať už nedostatku nebo nadbytku vybraných složek potravy na stav kostní hmoty, na její odolnost, metabolismus a funkci.

1.1 Kost

Oporou celého lidského těla je kostra. Kostra, na níž se upínají svaly a šlachy, je tvořena 220 kostmi a odpovídá přibližně 15 % celkové tělesné hmotnosti člověka. Kostí, svaly a šlachy jako celek umožňují pohyb lidského těla. Kostí jsou nejen opěrným, ale také ochranným prvkem pro vnitřní orgány, pro mozek, plíce a srdce. Významnou funkcí kostí je krvetvorba, která probíhá v červené kostní dřeni některých kostí. Další funkcí je ukládání a následné opětovné využití minerálů jako jsou vápník,

hořčík a fosfor. Kost tvořená kostní tkání je velmi tvrdá struktura tvořená buňkami, vazivovými vlákny a mezibuněčnou hmotou.

Kost je tvořena dvěma typy kostní tkáně - kostí kompaktní neboli kortikální, která se nachází na povrchu kosti, a kostí trabekulární neboli trámčitou, houbovitou, která se nachází uvnitř kosti. Dutinky mezi trámčinou houbovité kosti větších kostí jsou vyplněny kostní dřeví, v drobnějších kostech se kostní dřevě nenachází.

Povrch kosti je tvořen periostem, okosticí. Jedná se o tuhou vazivovou vrstvu, která má dvě vrstvy - zevní fibrózní a vnitřní buněčnou s Sharpeyovými vlákny, které zasahují do povrchu kosti a tím upevňují periost ke kosti.

Povrch všech kostí v organismu je tvořen hutnou kompaktní kostní tkání. Kompaktní kost je z 90 % kalcifikována, je hustá a pevná a udává tak mechanické vlastnosti skeletu, jako je pevnost v tahu, tlaku a ohybu. Tento typ kostní tkáně má nízký poměr plochy k objemu, má nízký remodelační obrát a tvoří přibližně 80 % lidské kostry. V průběhu roku se obmění přibližně 2,5 % celkového množství kortikální kosti, což je 10krát méně než u kosti trabekulární. Kompaktní kostní tkáň, *substantia compacta*, neboli kost kortikální je tvořena koncentricky uspořádanými lamelami orientovanými rovnoběžně s osou kosti. Základní stavební jednotkou je Haversův systém (osteón). Osteón je tvořen 6-15 lamelami uspořádaných kolem centrálního kanálku, kterým prochází krevní kapiláry a nervová vlákna. Lamely se skládají ze svazků rovnoběžně probíhajících kolagenních vláken zalitých do amorfni mezibuněčné hmoty. Ve stěnách lamel jsou vyhloubeny komůrky (lakuny) vyplněné osteoblasty (osteocyty). Ze dna lakun začínají jemné kostní kanálky (*canaliculi ossium*), do kterých osteoblasty vysílají své výběžky a umožňují tak vzájemný kontakt buněk. Osteón je tedy komplex vzájemně se různě křížících kolagenních vláken s různým stupněm mineralizace. Mezery mezi Haversovými systémy jsou vyplněny systémem vmezeřených, intersticiálních lamel, tedy zbytky Haversových systémů, které zanikly během růstu a přestavby kosti.

Trámčitá, houbovitá, trabekulární kostní tkáň, *substantia spongiosa* tvoří přibližně 20 % lidské kostry. Probíhá v ní intenzivní látková výměna a remodelace kosti. Trabekulární kostní tkáň se nachází pod vrstvou kompakty a uvnitř kosti. Je tvořena lamelózně uspořádanými trámečky kostí, které vytvářejí prostorovou síť. Tvar této sítě vzniká působením různých mechanických sil a to v průběhu celého života. Celkově hovoříme o architektonice kostní tkáně.

Kosti rozdělujeme podle tvaru na dlouhé, krátké a ploché. Dlouhá kost má dvě části: střední část - diafýzu a koncovou část tvořenou jednou nebo dvěma kloubními hlavicemi - epifýzu. Diafýza obsahuje kompaktní kostní tkáň a epifýza je tvořena trámčitou kostní tkání a na povrchu tenkou vrstvou kompakty. Uvnitř diafýzy dlouhých kostí se nachází kostní dřeň. Mezi diafýzou a epifýzou se nachází metafýza, která je důležitá pro růst kostí do délky. Na povrchu krátkých kostí je tuhá vrstvička kompakty, uvnitř je spongióza, dřeňová dutina se nevytváří. Ploché kosti, např. lopatka, jsou poměrně tenké. Na povrchu je vrstva kompakty, pod ní se nachází spongióza, která je až do pozdního věku vyplněna krvetvornou dřeví.

Dřeňovou dutinu uvnitř kosti vyplňuje kostní dřeň. Červená kostní dřeň je tvořena krevními vlásečnicemi, které prostupují sítí retikulárních vláken. Nalézají se zde výchozí buňky pro tvorbu všech základních typů červených i bílých krvinek, krevních destiček a kostních buněk v různých stupních zralosti. V průběhu života se červená kostní dřeň mění na žlutou kostní dřeň vyplněnou tukovými buňkami a ztrácí svoji schopnost krvetvorby. Červená kostní dřeň přetrvává v dospělosti pouze v trabekulární části dlouhých kostí, v kosti lebeční, kosti hrudní, v žebrech, v kostech klíčních, lopatkových a pánevních.

Kost vzniká procesem osifikace z vazivového (dezmogenní osifikace) nebo chrupavčitého základu (chondrogenní osifikace). Oba tyto osifikační procesy mají stejný průběh. A to nejprve přeměnu původního modelu, vazivového nebo chrupavčitého, ve fibrilární kost. Hovoříme o tzv. primární osifikaci. Poté se mění vnitřní struktura fibrilární kosti ve strukturu kosti lamelární. Jedná se o osifikaci sekundární.

Růst kosti do šířky a do délky je odlišný. Do šířky roste kost apozicí z hlubokých vrstev periostu a endostu. Proces apozice je doplněn procesem resorpce kosti. Oba tyto procesy zajišťují remodelaci kostí. Tím je zachován tvar a proporce kosti. Do délky roste kost pomocí růstových chrupavek, které se nacházejí mezi epifýzou a diafýzou na obou stranách dlouhých kostí. Ploché a krátké kosti končetin mají růstovou chrupavku jen jednu.

Růst kosti je ovlivněn mnoha faktory. Mezi neovlivnitelné patří vnitřní faktory genetické. Mezi další vnitřní faktory patří vlivy hormonální. Mezi snadno ovlivnitelné, vnější faktory, patří výživa a vliv mechanických faktorů, tedy směr a stupeň zatížení.

Celý cyklus remodelace kosti, její růst a odbourávání, probíhá pomocí dvou typů buněk, osteoblastů a osteoklastů.

Osteoblasty jsou jednojaderné buňky mezenchymálního původu přibližně kubického tvaru s četnými, poměrně dlouhými výběžky, kterými jsou v kontaktu s dalšími osteoblasty. Pomocí těchto kontaktů se realizuje látková výměna kosti. Osteoblasty jsou bohatě vybaveny organelami, což svědčí o jejich vysoké schopnosti tvořit bílkoviny. Mezi jejich produkty patří mezibuněčná hmota jak vláknitá (kolagenní vlákna), tak i amorfni (proteoglykany). Osteoblast vyprodukuje asi 500 krychlových mikrogramů mezibuněčné hmoty denně, tj. třikrát více než je jeho hmotnost. Osteoblasty jsou nejprve uloženy na povrchu tvořících se trámců a lamel, ale postupně se "zanořují" do novotvořené kosti, která mineralizuje. Primární mineralizace začíná po zanoření osteoblastu do novotvořené kosti a vytvoří se během ní asi 50 % z celkové mineralizace. Po ukončení remodelačního cyklu začíná sekundární mineralizace, kdy dochází k pomalému vyžívání minerálních částí, zvyšování počtu a velikosti krystalů. Osteoblasty postupně redukují svoji organelovou výbavu, zatahují výběžky a mění se protáhlé kostní buňky - osteocyty. Osteoblasty jsou stimulovány aktivním vitamínem D, estrogenem, kalcitoninem, parathyroidním hormonem (PTH, parathormon), interleukinem 6 a transformujícím růstovým faktorem beta (TGF- β , transforming growth factor beta). Osteoblasty vytváří kostní izoformu alkalické fosfatázy (bALP), receptory pro parathyroidní hormon a 1,25-dihydroxycholecalciferol, kolagen typu I, osteokalcin a osteonektin.

Osteocyty díky svému vzájemnému propojení s jinými osteocyty a kostním povrchem prostřednictvím lakun a kanálků umožňují látkovou výměnu a produkují významné množství kostních bílkovin. Kromě této metabolické funkce, mají osteocyty i funkci „mechanickou“. Jsou schopné reagovat na mechanické zatížení diferenciací osteoidu. Velký význam mají v reparaci mikrofraktur vznikajících v průběhu celého života. Doba jejich života je přibližně 20 let.

Osteoklasty jsou velké buňky až s padesáti jádry. Původem pochází z hematopoetických kmenových buněk řady mononukleárních fagocytů. V době růstu kosti je jejich počet poměrně vysoký, v dospělosti dosahuje asi 1 % (Vyskočil, 2009). Tyto buňky se v procesu kostní přestavby uplatňují celý život. Na povrchu kosti se nacházejí v tzv. Howshipových lakunách a pomocí specifického integrinu jsou propojeny s kostní matrix. Osteoklasty pomocí své zřasené membrány v kyselém prostředí odbourávají mineralizovanou kostní tkáň. Kyselé prostředí je udržováno činností protonové pumpy transportního proteinu (přenášejícího $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$).

Na degradaci kostní tkáně se kromě kyselého prostředí uplatňují také enzymy, např. bALP. Osteoklasty vytváří také receptory pro kalcitriol, IL-6 a kalcidiol, které jejich činnost podporují a také pro kalcitonin, estrogeny a androgeny, které naopak jejich funkci inhibují. Kromě toho produkují osteoklasty také bílkoviny, jako je TGF- β , ligand pro aktivátor receptoru pro nukleární faktor kappa-B (RANKL), které podporují růst a diferenciaci osteoblastů.

Kostní buňky obklopuje mezibuněčná kostní hmota. Ta je jako u všech pojivových tkání tvořena svazky kolagenních vláken. Tato proteoglykanová hmota je v kostní tkáni mineralizována krystalitami fosforečnanu vápenatého, uspořádaného ve formě hydroxyapatitu. Krystalitové jehlice jsou vázány na kolagenní vlákna v místech, kde jsou mezery mezi jednotlivými tropokolagenovými molekulami. Obsah minerálů a stupeň mineralizace je různý nejen v různých typech kosti, ale také v rámci jedné kosti. Méně mineralizované jsou kosti s převahou trabekulární kostní tkáně, např. obratle.

Kostní remodelace je několikastupňový proces zahrnující fázi klidu, resorpce, zvratu, rané a pozdní novotvorby. Během fáze resorpce dochází k aktivaci osteoklastů s následnou resorpcí kosti v Howshipově lakunách, fáze trvá asi tři týdny. Následuje fáze zvratu, kdy do míst resorbované kosti nasedají osteoblasty a připravuje se novotvorba kosti. Po přibližně 14 dnech začíná fáze rané novotvorby kosti, kdy se tvoří osteoidy. Nejdelsí fází je fáze pozdní tvorby, kdy dochází k mineralizaci osteoidu, tato fáze trvá asi 130 dní. Poslední fází je přeměna osteoblastů v ploché endosteální buňky. Tato fáze může trvat i několik let (Vyskočil, 2009).

Kostní remodelace je řízena účinným regulačním systémem založeným na spolupráci všech typů kostních buněk včetně jejich prekurzorů a na vlivu hormonů, cytokinů a signálních faktorů, výživy, mechanické zátěže a různých transkripčních faktorů a genů.

1.2 Vyšetřovací metody

K posouzení stavu kostní hmoty slouží několik typů vyšetření. Základem jsou metody zobrazovací: rentgenové vyšetření (rtg), densitometrie, ultrazvuk, počítačová tomografie (CT, computer tomography), mikro-CT a metody laboratorní. Mezi specializovanější vyšetření patří kostní biopsie, histomorfometrická analýza a scintigrafické vyšetření. K metodám experimentálním patří testování mechanických vlastností kostí.

Zobrazovací metody jsou metody, které více či méně zatěžují organismus pacienta různými druhy záření. Rentgenové záření je elektromagnetické vlnění s krátkou vlnovou délkou. Rentgenový snímek je významný při diagnostice kostních onemocnění, jako je *rachitis*, osteomalacie. Může upozornit na patologické změny na kostech souvisejících s některými onemocněními, jako je např. Pagetova choroba, hypofosfatémie. Pomáhá odhalit patologické zlomeniny nebo deformity u osteoporózy i jiných osteopatií. Nejčastěji se hodnotí obratlová těla. Zatížení pacienta při rtg snímkování je poměrně velké, ale pro diagnostiku choroby nezbytné.

Z pohledu zatížení organismu radiačním zářením je mnohem bezpečnější užití metod založených na absorpci rtg záření, tzv. absorpciometrie. Touto metodou lze stanovit hustotu kostní tkáně a obsah minerálu. Absorpciometrie používá mnohem menší dávky záření ve srovnání s rtg vyšetřením. Rozlišujeme absorpciometrii jednofotonovou a dvoufotonovou. Jednofotonová absorpciometrie (SPA, single photon absorptiometry) je vhodná pouze pro vyšetření periferního skeletu. Tato metoda vyžaduje přítomnost co nejmenšího množství měkké tkáně obklopující hodnocenou kost, proto je pro běžnou praxi nevhodná. Dvoufotonová absorpciometrie (DPA, dual photon absorptiometry) využívá záření o dvou různých energiích. Lze ji použít i na místa obklopená měkkou tkání.

Přesnější a rychlejší metodou ke stanovení hustoty kostní tkáně a obsahu minerálu oproti DPA je dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (DXA, dual energy X-ray absorptiometry). Tato metoda využívá slabé rentgenové záření o dvou energetických hladinách, které je pohlcováno kostí. Pomocí DXA metody je možné měřit nejen jakoukoliv část těla, nejčastěji obratlová těla, kyčel, krček femuru a předloktí, ale i celé tělo. Tato metoda patří mezi základní vyšetření při diagnostice osteoporózy či jiných kostních onemocnění. Obsah kostního minerálu se udává v jednotkách g/cm^2 , jedná se o tzv. kostní minerální hustotu (BMD, bone mineral density). Výsledky měření se vyjadřují ve formě směrodatných odchylek, jako tzv. T-skóre. T-skóre je počet směrodatných odchylek (SD, standard deviation) vypočítaný porovnáním BMD pacienta s průměrnou hodnotou mladých zdravých jedinců s maximem kostní hmoty (PBM, peak bone mass). Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organisation) hodnotí stav kostní hustoty na základě hodnot T-skóre. Jako normální BMD je označena hodnota T-skóre do $-1,0$ SD, jako osteopenie hodnota T-skóre mezi $-1,0$ a $-2,5$ SD a jako osteoporóza je hodnoceno T-skóre pod $-2,5$ SD. Toto dělení platí pro bílé ženy po menopauze. Pro ostatní ženy,

muže a děti speciální kritéria podle WHO nejsou. Mezi poklesem hodnoty T-skóre a rizikem zlomeniny neplatí přímá úměra, snížení kostní hmoty o 1 T-skóre minimálně zdvojnásobuje riziko zlomeniny (Štěpán, 1997). Dalším pojmem užívaným v souvislosti s měřením kostní minerální denzity je Z-skóre. Z-skóre je počet směrodatných odchylek (SD) vypočítaný porovnáním BMD pacienta s průměrem zdravé populace stejného pohlaví a stejného věku. Z-skóre je vhodné pro hodnocení seniorů nad 75 let věku a dětí.

K měření kostní hmoty je možno využít i další metody, jako je ultrazvuk, periferní kvantitativní počítačová tomografie (pQCT, peripheral quantitative computer tomography), pQCT s vysokým rozlišením (hr-pQCT, high resolution pQCT), mikro MRI (MRI, magnetic resonance imaging, magnetická rezonance), scintigrafie a invazivní metoda odběru vzorku kostní tkáně biopsií.

Ultrazvuk je metoda levnější a rychlejší než DXA. Je vhodná pro skrínink, určení kvality kostní hmoty, ale nehodí se k monitorování účinnosti terapie kostních onemocnění. K analýze se nejčastěji používá patní kost.

Kvantitativní počítačová tomografie (pQCT) také pracuje s rentgenovým zářením a její výhodou je třírozměrné zobrazení kostního minerálu (g/cm^3) a možnost rozlišení trabekulární a kortikální kosti. Tato metoda však vystavuje pacienta velkému radiačnímu zatížení.

Znalost architektiky kosti, tedy stavu kostní přestavby, je výhodná nejen při rozhodování o správné diagnóze, ale také při hodnocení prognózy. Architektiku kosti lze posoudit pomocí vzorku kosti získaného kostní biopsií. Vzorek se nejčastěji odebírá z lopaty kosti kyčelní, případně z mediálního nebo laterálního kondylu tibie. Před provedením biopsie je potřeba podat flourochromy, např. tetracyklin, ve dvou intervalech, aby bylo možné posoudit stav kostní formace. Tato metoda nejen nepohodlná a bolestivá pro pacienta, je také finančně nákladná a vyžaduje zvláštní zacházení se vzorkem, odběr, uchovávání a zpracování. Její výpovědní hodnota je však nezastupitelná.

V současnosti je metoda invazivní kostní biopsie nahrazována metodou neinvazivní. Touto metodou je vysokorozlišovací periferní počítačová tomografie (hr-pQCT). Metoda nevyžaduje chirurgické zásahy, ale zatěžuje pacienta rentgenovým zářením, i když mnohonásobně nižším než běžné rtg vyšetření. Vyšetření je nejčastěji prováděno na distální části radia nebo na distální části tibie a poskytuje třírozměrné zobrazení kostního minerálu. Metoda hr-pQCT má ve srovnání s pQCT mnohem vyšší

prostorové rozlišení, umožňuje nám rozlišit trabekulární a kortikální kost, změřit počet a tloušťku trabekul, sílu kortikální kosti a objem kostní hmoty. Metoda je ovšem velmi finančně nákladná a vyžaduje speciální vybavení.

Další možností 3D zobrazení kostní mikroarchitektury je využití mikro-MRI. Výhodou této metody je vyšší přesnost zobrazení, vyšší rozlišení a absence využití ionizujícího záření. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací i provozní náklady. Metoda využívá magnetických vlastností atomových jader vodíku pro zobrazení struktury vnitřních orgánů, zobrazení mozku, míchy a dalších měkkých tkání. Narozdíl od CT nevystavuje pacienta rentgenovým paprskům. Pacient je vystaven silnému magnetickému poli, které nemá na lidské tkáně žádný prokázaný škodlivý účinek, ale může být nebezpečná pro lidi s kardiostimulátorem nebo jiným cizorodým materiálem v těle.

Další vyšetřovací metodou je scintigrafie. Scintigrafie je radionuklidová metoda zobrazující oblasti kosti se zvýšenou metabolickou aktivitou. Tato metoda našla uplatnění v diagnostice převážně maligních i benigních onemocnění skeletu, metastáz, ale význam má také u nezhoubných onemocnění, zánětů a zlomenin (Pagetova nemoc, Sudeckova osteodystrofie, aseptické kostní nekrózy). Principem metody je intravenózní podání bisfosfonátů značených ^{99m}Tc Techneciem s následnou detekcí pomocí gammakamery.

V současné době patří mezi nejpoužívanější zobrazovací metody rtg vyšetření a osteodenzitometrické metody. Do popředí se dostávají i metody hr-pQCT.

1.3 Biomechanické testování

Pevnost a elasticita kosti souvisí s vlastnostmi kostního materiálu a s geometrickými vlastnostmi. Za vlastnosti kostního materiálu považujeme celkový objem kosti, stupeň mineralizace, podíl kolagenních a nekolagenních složek, podíl kortikální a trabekulární kosti a tloušťku kortikální kosti, která významně ovlivňuje sílu kosti (Comelekoglu *et al.*, 2007). Geometrické vlastnosti, tedy uspořádání trabekulární sítě a kortikálních lamel, jsou dány uspořádáním krystalů a kolagenových vláken. Pevnost kosti je dána stupněm mineralizace kosti, elasticita souvisí s organickou složkou kostní tkáně, její kvantitou a kvalitou.

Mechanické vlastnosti kosti se hodnotí testováním odolnosti kosti vůči tlaku, odolnosti v tahu a odolnosti v torzi.

Testování mechanické odolnosti materiálu je široce využívaná metoda v mnoha různých odvětvích, např. stavební, strojírenský nebo textilní průmysl, a má široké uplatnění také v medicínské oblasti. V medicínské oblasti se využívá ke sledování vlastností uměle vyráběných náhrad a ke sledování změn mechanických vlastností u svalů, šlach a kostí. Tento biologický materiál vykazuje na rozdíl od průmyslového materiálu značnou heterogenitu.

Nejčastěji experimentálním zvířetem používaným k testování mechanických vlastností svalů, šlach a kostí, je potkan. U zvířecích modelů se používají k testování celé kosti (*femur, tibie, humerus, radius*, metatarsální kůstky, *mandibula* - Jiang *et al.*, 2008), nebo kortikální i trabekulární části kostní hmoty upravené do specifických geometrických tvarů (např. cylindrů). Tato metoda je používána nejen u zvířecích modelů (Lepola *et al.*, 1996), ale také u lidských vzorků, kde jiný způsob testování není možný (Wang *et al.*, 2001).

K testování mechanické odolnosti kosti jsou používány komerčně dostupné přístroje, bohužel s velmi vysokou pořizovací cenou, např. Instron, MAY 03, USA (Comelekoglu *et al.*, 2007), Shenk-Trebel model RTP 0.6 (Moro-Alvarez *et al.*, 2009), Avalon Technologies, USA (Lind *et al.*, 2000; Herlin *et al.*, 2010), MZ500D, Maruto Co, Japonsko (Iwamoto *et al.*, 2006), LR5K J.Lloyd Instruments, UK (Leppänen *et al.*, 2008), 145660 Z020/TND, Zwick/Roell, Německo (Stürmer *et al.*, 2006). Velké množství autorů využívá tzv. „custom-made material testing machine“ neboli „na zakázku“ vyrobené přístroje (Herlin *et al.* 2010; Jämsä *et al.*, 1998; Lepola *et al.*, 1996). Konstrukce všech těchto přístrojů vycházejí z práce Peng *et al.* (1994). Na rozdíl od drahých komerčních přístrojů nemají tyto „na zakázku“ vyrobené přístroje software, nejsou tedy schopné vypočítat např. parametry pružnosti, zastoupení kompaktní a spongiózní kosti, či vytvořit systém validace. Většina těchto přístrojů ovšem umožňuje zaznamenat maximální sílu, kterou bylo nutno vyvinout, aby došlo k fraktuře testované kosti.

Odolnost kosti v tlaku se testuje vertikálním působením síly na kost, jedná se o testování odolnosti v ohybu (*femur, humerus, tibie*) a o kompresní test (krček femuru, tělo obratle).

Nejčastěji používanou metodou testování odolnosti v ohybu je metoda třibodového ohýbání kosti (TPB, three-point bending). Tato metoda je nejčastěji založená na principu testování odolnosti diafýzy dlouhé kosti vůči tlaku. Je však možné testovat také odolnost distální části femuru nebo proximální části tibie (Herlin *et al.*,

2010). Testovaná kost se umístí na dvě podpěry vzdálené od sebe na určenou vzdálenost, třetí (vrchní čepel) působí kolmo shora dolů na střed diafýzy kosti. Přístroj zaznamenává maximální sílu potřebnou ke zlomení kosti. Modernější přístroje zaznamenávají kromě maximální síly působící na kost před zlomením také tvrdost a absorpci energie v tzv. křivce zátěžového posunutí (zátěžově-deformační křivka).

Čtyřbodové ohýbání se liší v tom, že shora dolů na kost působí místo jedné čepelce dvě. Drobnou komplikací této metody ve srovnání s třibodovým ohýbáním je podmínka, aby se obě čepelce dotkly kosti ve stejný okamžik (McCann *et al.*, 2008).

Třibodové, případně čtyřbodové ohýbání, jsou metody, které mají mnoho možností nastavení a liší se autor od autora. Pro každý experiment je tedy nutné metodu nastavit, určit vzdálenost podpěr, polohu kosti, rychlost testování a použití stabilizačního napětí. Je také nutné snažit se v průběhu testování eliminovat vnější vlivy, které by mohly zkreslit výsledek testování.

Co se týká samotného přístroje, tak je potřeba zajistit, aby podpěry byly hladké se zakulacenými hranami, čímž se zabrání hromadění tlaku a „zařezávání“ podpěr do kosti v místě kontaktu. Důležitost kontaktu obou čepelí s kostí ve stejný čas u čtyřbodového lámání, byla již zmíněna. Je to ovšem obtížně proveditelné vzhledem k nepravidelným tvarům kostí. Částečně se tomu můžeme vyhnout, bude-li vzdálenost mezi čepelci co nejmenší. Dalším variabilním parametrem je vzdálenost spodních podpěr. Turner a Burr (1993) tvrdí, že vzdálenost spodních podpěr by měla být pro samice potkanů 15 mm a pro samce 20 mm, aby se zajistilo, že z 58-90 % bude deformace způsobena ohýbáním. Není-li splněna tato podmínka, zapojuje se také smyková deformace, která snižuje Youngův modul. Youngův modul pružnosti neboli modul pružnosti v tahu nebo v tlaku je charakteristikou materiálu a závisí pouze na jeho vlastnostech. I někteří další autoři používali konstantní vzdálenost mezi spodními podpěrami v závislosti na velikosti kostí, které byly testovány, např. 10 mm (Jiang *et al.*, 2008; Herlin *et al.*, 2010) nebo 15 mm (Bagi *et al.*, 2006; Iwamoto *et al.*, 2006). Jinou možností nastavení vzdálenosti spodních podpěr je dle Leppänen *et al.* (2006) tak, že jedna podpěra je pod velkým trochanterem (*trochanter maior*) a druhá pod distálním koncem femuru.

Další otázkou je směr působení čepelce při testování, tedy jaká bude poloha kosti. Nepravidelný tvar kosti zde hraje důležitou roli. Například u femuru se jak z anatomických, tak z praktických důvodů dává přednost testování v předozadním směru (anteroposteriorním, AP) (Jämsä *et al.*, 1998; Järvinen *et al.*, 1998).

Ovšem Leppänen *et al.* (2006) tvrdí, že vzhledem k funkční adaptaci kosti na zátěž, je vhodnějším směrem testování středoboční (mediolaterální, ML). Femur má v tomto směru největší eliptický průměr diafýzy a představuje zřejmě primární směr adaptace kosti na zatížení (Leppänen *et al.*, 2006; Leppänen *et al.*, 2010). Při testování v mediolaterálním směru je ale nutné zabránit otáčení femuru na anatomicky přijatelnější anteroposteriorní stranu zafixováním interkondylární části, např. uchycením do kleští. Tímto vnějším zásahem ovšem dochází k ovlivnění mechanických vlastností kosti (Leppänen *et al.*, 2006).

Ohýbací síla může být aplikována různou rychlostí: 50 mm/s (Stürmer *et al.*, 2006), 1 mm/s (Leppänen *et al.*, 2006; Järvinen *et al.*, 1998), 0,5 mm/s (Herlin *et al.*, 2010), 0,155 mm/s (Jämsä *et al.*, 1998), 0,1 mm/s (Leppänen *et al.*, 2008), 20 mm/min (Bagi *et al.*, 2006; Iwamoto *et al.*, 2006), 5 mm/min (Jiang *et al.*, 2008), 2 mm/min (Brzóska *et al.*, 2005).

Před vlastním lámáním je testovaná kost zatížena malým stabilizujícím napětím do 10 N, např. 0,5 N (Bagi *et al.*, 2006), 1 N (Stürmer *et al.*, 2006), 10 N (Leppänen *et al.*, 2008). Zatížení malým stabilizujícím napětím kost fixuje a zabraňuje tak jejímu protáčení.

Dalším parametrem ovlivňujícím výsledky samotného testování je příprava vzorku. Kost je potřeba důkladně očistit od měkkých tkání. Odstraňování měkkých tkání je nutné provádět opatrně, aby nedošlo k poškození povrchu kosti a tím ke zkreslení výsledků testování. Dále je potřeba zabránit vysychání kostní tkáně před a po dobu testování, např. zabalením do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem.

Většina testů probíhá za pokojové teploty, ale např. Iwamoto *et al.* (2006) testoval tříbodové ohýbání u femurů potkanů Sprague-Dawley po třech minutách v solné lázni při teplotě 37 °C, aby se co nejvíce přiblížil podmínkám živého organismu.

Dalším testem, poměrně hojně používaným k testování odolnosti kosti v tlaku, je kompresní test. Kompresi neboli stlačování, jsou nejčastěji vystavovány těla obratlů a krčky femurů. Ke kompresnímu testu lze použít jak celé kosti, tak jen části. Tato metoda je ovšem náročná na přípravu testovaného materiálu. Kromě již výše zmíněného dokonalého očištění kosti od měkkých tkání je potřeba testovaný vzorek uchytit ve speciálním fixačním zařízení, aby se zabránilo pohybu vzorku. K tomuto ukotvení se používají polyakrylamidové pryskyřice. Při testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku je potřeba femur nebo jeho proximální část (získanou jako zbytek

po tříbodovém ohýbání) upevnit kolmo k podložce. Hlavice femuru se opět zatíží malým stabilizačním napětím do 10 N. Síla je aplikována v podélné ose kosti, proto je nutné výše zmíněné správné zafixování kosti. Vrchní čepel tlačí na hlavici femuru až do zlomení krčku femuru nebo do rozdrčení obratle. Rychlost stlačování je opět volitelná: 0,155 mm/s (Jämsä *et al.*, 1998; Herlin *et al.*, 2010), 1 mm/s (Leppänen *et al.*, 2006; Järvinen *et al.*, 1998), 2 mm/min (Brzóska *et al.*, 2008; Brzóska *et al.*, 2004), 6 mm/min (Brzóska *et al.*, 2005).

Dalším způsobem testování mechanických vlastností kostí je torzní test. Tento test dává informaci o smykovém napětí před samotným zlomením. Pro tento test se stejně jako u kompresního testu mohou kromě celých kostí používat také části kostí upravené do specifických tvarů. Test může být prováděn na všech typech kostí a v různých orientacích. Příprava testované kosti je opět náročnější. Konce kostí musí být před uchycením upraveny abrasivním papírem. Tím se zlepší přichycení polyakrylamidu, do něhož jsou oba konce kosti zality, a takto upravené konce jsou sevřeny do svěráku. Zabrání se tím drcení konců kostí při testování. Délka kosti, která je vystavena torzi se zaznamenává a je nutné, aby byla konstantní. Různí autoři používají různou úhlovou rychlost otáčení, ovšem pro celý experiment musí být konstantní: 4,8 °/s (Nazarian *et al.*, 2009), 4 °/s (Lind *et al.*, 2000), 6 °/s (Lepola *et al.*, 1996), 10 °/min (Moro-Alvarez *et al.*, 2009). Významný je také směr torze, který musí být v jednom experimentu stejný. Zaznamenává se torzní síla potřebná ke zlomení kosti (Nm), přičemž některé přístroje zaznamenávají také úhel zlomení (°, rad). Další parametry jako je mezní torzní síla, tuhost, smykový tlak a smykový modul je možné následně vypočítat. Testování odolnosti kosti v torzi je metoda používaná již od 70. let 19. století (Strömberg a Dalen, 1976). Přístroj sestavený Strömbergem a Dalenem (1976) byl k testování torzní síly používán mnoha dalšími autory (Mattila *et al.*, 1999; Lepola *et al.*, 1993).

Tahový test je dalším typem testu používaným k hodnocení mechanických vlastností kostí. Tento test je hojněji používán při testování elastických materiálů, jako jsou svaly a šlachy. U kostí se používá u dlouhých kostí. Kost se upevní horizontálně pomocí polyakrylamidové pryskyřice stejným způsobem jako při torzním testu. Vzdálenost mezi konci upevňovacího zařízení je volitelná, např. 3 mm (Comelekoglu *et al.*, 2007), ale musí zůstat konstantní v rámci jednoho experimentu. Testované kosti jsou opět vystaveny malému počátečnímu napětí 5-10 N. Rychlost tahové zátěže může být 2 mm/min (Comelekoglu *et al.*, 2007) nebo 1 mm/s (Comelekoglu *et al.*, 2007).

Maximální zatížení představuje maximální tahovou sílu, která musela být aplikována, aby došlo k fraktuře. Hodnoty intenzity tahu před zlomením je možné zaznamenat jako křivku. Sklon lineární části křivky zátěžového posunutí definuje tvrdost a plocha pod touto křivkou definuje energetickou absorpční kapacitu. Z křivky tlak-pevnost je možné určit mezní tlak, mezní pevnost a modul pružnosti (Comelekoglu *et al.*, 2007).

V experimentech se výše popisované metody často kombinují. Největší omezením při tomto způsobu testování je množství materiálu.

1.4 Biochemické metody

Kromě výše zmíněných metod se k hodnocení stavu kostního metabolismu používá také laboratorní vyšetření. 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). Hodnotí se také ukazatelé stavu jater a ledvin: alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), gamma-glutamyltransferáza (GMT), bilirubin, urea a kreatinin. K dalším vyšetřením patří hodnocení vlastních parametrů kostního metabolismu, jako jsou enzymy specifické pro osteoblasty a osteoklasty nebo neenzymové peptidy.

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, amino-terminal telopeptide; CTX, carboxy-terminal telopeptide), tartát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP, tartat resistant acid phosphatase), 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, tumor necrosis factor), monocyto-makrofágový faktor stimulující kolonie (M-CSF, macrophage colony-stimulating factor), interferon γ (INF- γ), transformující růstový faktor β (TGF- β , transforming growth factor β), kostní morfogenetický protein (BMP, bone morphogenetic protein) a osteoprotegerin (OPG).

1.4.1 Kostní izoforma alkalické fosfatázy

Alkalická fosfatáza, ALP, je ubiquitární ektoenzym (130-220 kDa), který hydrolyzuje monoestery kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. ALP vázaná na membránu buněk je složená ze 4 podjednotek a v krvi cirkuluje jako dimer. Každá z podjednotek má jednu aktivní stranu, obsahuje dva atomy Zn^{2+} stabilizující terciální strukturu a vyžaduje Mg^{2+} jako kofaktor.

Rozlišujeme tři izoenzymy ALP: placentární, střevní a izoformy obsažené v kostech, játrech a ledvinách. Izoenzymy se liší primární strukturou, jsou kódovány různými geny. Izoformy v kostech, játrech a ledvinách, nazývané tkáňově nespecifické enzymy (TNALP, tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza), se liší v počtu sacharidů, včetně kyseliny sialové v molekule, což je dáno posttranslační modifikací. U zdravých dospělých bez poruchy jaterních funkcí je přibližně polovina celkové aktivity sérové ALP tvořena jaterní ALP, 40 % kostní a až kolem 10 % střevní ALP. U dětí a dospívajících je naprostá většina sérové ALP tvořena kostní ALP. U těhotných žen je významný podíl tvořen placentární ALP. Některé nádory mohou ALP produkovat, ta je pak podobná placentární nebo střevní ALP. Alkalická fosfatáza je obsažena v řadě tkání, proto je při stanovení potřeba odlišit kostní izoformu, hlavně od jaterní, protože enzym z ledvin se v krvi nevyskytuje.

Celková ALP je široce užívaný marker kostního metabolismu z důvodu dostupnosti levné a jednoduché metody. Sérová hladina celkové ALP poskytuje pohled na novou kostní tvorbu a aktivitu osteoblastů, slouží k identifikaci osob s rizikem osteoporózy nebo jiných onemocnění kostí a k monitorování antiresorpční terapie. Hlavní izoformy ALP lze stanovit při jejich vzájemném oddělení např. imunoanalýzou (vazbou na protilátky), elektroforézou, precipitací pomocí lektinů, termoinaktivací či inhibicí L-fenylalaninem.

Kostní izoforma alkalické fosfatázy (bALP) je k vnější straně buněčné membrány osteoblastů připojena karboxyterminální glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou. Působením fosfolipázy je kostní ALP uvolněna jako homodimer z membrány do cirkulace. V cirkulaci má dlouhý biologický poločas (1-2 dny), což nejspíše přispívá k nízké denní a biologické variabilitě. Jako většina glykoproteinů je odstraňována z cirkulace játry pomocí galaktózového receptoru. Při aktivaci osteoblastů lze tento enzym ve zvýšené aktivitě prokázat v krevním séru.

ALP má široké optimum pH a proměnlivou substrátovou specifitu *in vitro*, což odráží koncentraci a typ sloučeniny s fosforem, která je hydrolyzována. Hydrolytická

aktivita může štěpit fosfoestery nebo Ppi (anorganický difosfát), jenž je zároveň silným kompetitivním inhibitorem ALP (Whyte, 1994).

Sérové aktivity izoenzymů ALP jsou u potkanů a lidí rozdílné (Koyama *et al.*, 1987). V séru potkanů byly identifikovány tři izoformy střevní ALP a jedna izoforma kostní TNALP, jaterní izoformu nelze za fyziologických podmínek v séru potkanů detekovat (Kominami *et al.*, 1984). Největší rozdílnost v aktivitě ALP v séru potkanů a lidí byla zjištěna u střevní a jaterní izoformy, naopak vlastnosti kostní izoformy jevíly u obou druhů největší podobnosti. Obě kostní izoformy mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako retenční čas a elektroforetická pohyblivost. Ani u potkanů ani u lidí se nepodařilo rozdělit kostní izoformu ALP na jednotlivé frakce (Dziedziejko *et al.*, 2005). Izoenzymy potkanů a lidí jsou rozdílné, nicméně u TNALP potkanů byla zjištěna 90% homologie v sekvenci aminokyselin TNALP lidí (Hoshi *et al.*, 1997).

Předpokládá se, že ALP hraje klíčovou roli převážně v časných stádiích mineralizace. ALP patří mezi první funkční geny exprimované v prvních fázích kalcifikace. Byly vysloveny dvě hypotézy popisující roli ALP v procesu mineralizace. První předpokládá jako hlavní funkci TNALP zisk Pi (anorganický fosfát) pro vznik hydroxyapatitových krystalů. Druhá hypotéza předpokládá účast TNALP při hydrolýze Ppi, čímž následně usnadňuje růst krystalů hydroxyapatitu. Ppi, jakožto inhibitor mineralizace, je v současné době považován za klíčový regulátor kalcifikace. TNALP tedy reguluje hladinu Ppi (Golub a Boesze-Battaglia, 2007). Tuto druhou hypotézu podporuje stav pacientů s hypofosfatázou, dědičným onemocněním způsobeným mutací genů pro TNALP. Onemocnění se projevuje poklesem nebo absencí hladin ALP a zvýšením hladin Ppi (Whyte, 1994).

1.4.2 Osteokalcin

Osteokalcin, OC, je druhý nejhojnější protein kostní matrix. Byl objeven v roce 1976 Pricem *et al.* (1976) a Hauschkem *et al.* (1975). Jedná se o nekolagenní protein produkovaný osteoblasty o velikosti asi 6 kDa obsahující γ -karboxyglutámovou kyselinu. Kromě osteoblastů ho tvoří také osteocyty a odontoblasty. OC je syntetizován osteoblasty karboxylovaný třemi zbytky kyseliny glutámové (ucOC, undercarboxylated osteocalcin). Tato rezidua jsou následně γ -karboxylázou přeměněna na karboxyglutámovou kyselinu (tzv. Gla-rezidua) a poté je tento intaktní OC uvolněn z buňky. K tvorbě je zapotřebí kalcitriol a vitamín K. Tento nově vytvořený OC, intaktní OC, je většinou absorbován (60-90 %) do kostní matrix vazbou

na hydroxyapatit pomocí Gla-reziduí, ale část ho také uniká do cirkulace, kde může být detekován.

Osteoblasty syntetizují sice pouze intaktní OC, ale ten může později projít intracelulárními procesy nebo být po sekreci degradován, což vede k tvorbě menších fragmentů rovněž detekovatelných v cirkulaci. U intaktního osteokalcinu dochází ke štěpení C-terminálního fragmentu za vzniku N-MID osteokalcinu (N-MID, N-terminální a MID fragment). Buňkami je také uvolňován ucOC, který nemá schopnost vázat se na hydroxyapatit a následně se dostává do cirkulace. Cirkulující OC je tedy směsí několika molekulových forem: intaktní OC (1-45), N-MID OC (1-43), C-terminální fragment (44-49), N-terminální fragment (1-19) a MID fragment (20-49).

Osteokalcin má malou molekulu, proniká tedy snadno i zdravým glomerulem a má velmi krátký biologický poločas (4 minuty) (Racek, 2006). Hladina osteokalcinu v krvi podléhá intra- i interindividuální diurnální variabilitě. Kromě denní a sezónní variability a stavu funkce ledvin ovlivňuje stanovení hladiny OC v krvi také jiná onemocnění, jako je hypothyreóza a hyperparathyreóza, kdy dochází k poklesu hladin, nebo zánětlivá onemocnění, při kterých se hladina OC zvyšuje (Vyskočil, 2009). Potíže při stanovení hladiny OC v krvi způsobuje také jeho špatná stabilita při pokojové teplotě a velké množství fragmentů v séru, kde každý reaguje různou intenzitou a různými protilátkami. Hladina OC v séru koreluje s hladinou ALP.

Většina OC, která je sekretována do krevního oběhu během kostní novotvorby, je intaktní forma. Intaktní OC je tedy považován za specifický marker kostní novotvorby. OC je kromě regulace aktivity osteoblastů také zahrnut do regulace metabolismu minerálů, je nutný ke stimulaci zrání kostního minerálu (Boskey *et al.*, 1998).

Expresi osteokalcinu je regulována různými faktory: parathyroidním hormonem (PTH), 1,25-dihydroxyvitaminem D (vitamín D₃), estrogeny, glukokortikoidy, růstovými faktory a cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP).

Osteokalcin je uložený do kostní matrix, tudíž musí být také uvolňován během resorpce. Dřívější studie předpokládaly, že cirkulující OC pochází pouze z biosyntézy osteoblastů a ne z rozpadu kostní matrix (Riggs *et al.*, 1986). Později, při studiu pacientů s různými kostními metabolickými poruchami, bylo ale zjištěno, že ne všechny fragmenty OC v cirkulaci nebo periferních orgánech (ledviny, játra, plíce) jsou odvozené z katabolismu OC, ale také z OC uloženého v kosti (Gundberg *et al.*, 1991). OC by tedy mohl sloužit jako marker kostní resorpce *in vitro* (Ivaska *et al.*, 2004).

Na základě závěrů těchto studií je v současnosti sérový OC považován spíše za marker kostního obratu než jen kostní novotvorby (Gundberg *et al.*, 1991; Ivaska *et al.*, 2004).

1.4.3 Kolagen I

V kostech nacházíme kolagen typu I a typu III. Převažující kolagen I je tvořený dvěma řetězci $\alpha 1$ a jedním řetězcem $\alpha 2$ a vytváří tzv. „triple helix“. Kolagen typu III je jen minoritní složkou a lze ho nalézt převážně ve velmi mladé tkáni, je tvořený třemi řetězci $\alpha 1$.

Kolagen je syntetizován uvnitř buňky z pro- α -řetězců, jež mají na obou koncích propeptidy, N- a C- (N-, aminoterminální; C-, karboxyterminální), které mají nehelikální charakter. Pro- α -řetězce uvnitř buňky dozrávají, podléhají hydroxylaci, glykosylaci a agregaci do trojšroubovice. Pro hydroxylaci je nezbytná přítomnost železa a kyseliny askorbové, protože společně s 2-oxoglutarátem působí jako kofaktor pro činnost hydroxyláz. Takto upravený kolagen se exocytózou dostává do extracelulárního prostoru. Další procesy probíhají již mimo buňku. Ztrátou nehelikálních segmentů vzniká tropokolagen neboli kolagenový monomer, základní součást kolagenu. Na C- a N- koncích stále zůstávají kratší nehelikální úseky. Následuje polymerace tropokolagenů za vzniku mikrofibrily. Mikrofibrily, spojené do kolagenních fibril, se poté zpevňují působením lisyoxidázy tvorbou příčných vazeb tzv. cross-links mezi ϵ -aminoskupinami zbytků lyzinu a hydroxylyzinu. Pro správnou tvorbu příčných vazeb je důležitá přítomnost mědi. Takto stabilizované kolagenní fibrily se skládají do vláken (Viguet-Carrin *et al.*, 2006).

V kostech je velmi důležitá architektura kolagenních vláken, ta rozhoduje o mechanické pevnosti a odolnosti. Fibrily se uspořádávají v závislosti na směru tlaku a tahu, který na ně působí, z tohoto důvodů je velmi důležité pravidelné a správné zatěžování kostí.

1.4.4 Amino-terminální propeptid prokolagenu I (PINP)

PINP (amino-terminal propeptide of type I collagen) je odvozen z kolagenu prvního typu. Po vyloučení prokolagenu do mezibuněčného prostoru jsou tyto propeptidy odštěpeny pomocí specifických endoproteáz a uvolněny do krevního oběhu (Merry *et al.*, 1976). PINP je pravděpodobně zodpovědný za další růst a změny kolagenních vláken (Vyskočil, 2009). Koncentrace cirkulujícího PINP je přímo úměrná

množství nové kolagenové a následně mineralizované matrix tvořící se kosti. Z tohoto důvodu sérový biomarker PINP koreluje s tvorbou kosti. Jeho molekula je bohatá na prolin a hydroxyprolin (Seibel *et al.*, 2005), má molekulovou hmotnost pouhých 70 kDa, z organismu je eliminován jaterními endoteliálními buňkami přes scavengerový receptor. Vykazuje nízkou intraindividuální variabilitu a nízké cirkadiální kolísání (Wheater *et al.*, 2013). Hojně se tento ukazatel využívá k monitorování účinnosti antiresorpční terapie u osteoporotických pacientů, i u Pagetovy choroby (Vyskočil, 2009). Ve studiích na hlodavcích se ukázal jako vhodný k posouzení kostní novotvorby u potkanů (Hale *et al.*, 2007; Rissanen *et al.*, 2008).

1.4.5 Karboxy-terminální propeptid prokolagenu typu I (PICP)

PICP (carboxy-terminal propeptide of type I collagen) vzniká působením peptidáz na pro- α -řetězec extracelulárně brzy po syntéze kolagenu za vzniku tropokolagenu. PICP má poměrně velkou molekulu, 115 kDa, proto jeho koncentraci neovlivňuje funkce ledvin (Racek, 2006). V krvi je přítomen jako dimer stabilizovaný disulfidickými vazbami. Je odbouráván jaterními endoteliálními buňkami přes manózoový receptor a má tedy krátký biologický poločas v séru, 6-8 minut. PICP je specifickým produktem proliferujících osteoblastů a fibroblastů. Není tedy zcela specifický pro kost. Zvýšené hladiny v séru jsou známkou rychlé kostní novotvorby, např. v případě Pagetovy choroby (Vyskočil, 2009) nebo osteoporózy. V současné době se tento ukazatel k hodnocení stavu kostní hmoty běžně nepoužívá.

1.4.6 N-terminální a C-terminální telopeptidy kolagenu typu I (CTX-I, NTX-I)

Telopeptidy jsou krátké aminokyselinové řetězce pocházející z nehelikálních konců molekuly kolagenu I při jeho odbourávání působením osteoklastů. Podle toho, zda se vyskytují na karboxyterminální či aminoterminální části kolagenu, se nazývají C-terminální telopeptid kolagenu I (CTX-I) či N-terminální telopeptid kolagenu I (NTX-I). CTX-I a NTX-I jsou navíc příčně spojeny pyridinolinovými molekulami tzv. kroslinky. Jedna molekula CTX-I se tedy skládá ze dvou C-terminálních fragmentů $\alpha 1$ řetězce kolagenu I, jednoho helikálního segmentu z $\alpha 1$ či $\alpha 2$ řetězce kolagenu I a příčně vazebných molekul pyridinolinu (PYD) nebo deoxypyridinolinu (DPD). CTX-I a NTX-I jsou uvolňovány z kostní hmoty během degradace kolagenu v poměru 1:1 a jsou považovány za markery kostní resorpce. Nevýhodou je však jejich poměrně malá

molekulová hmotnost (9-20 kDa), díky které jsou vylučovány ledvinami, jejichž funkce tedy výrazně ovlivňuje koncentraci těchto peptidů v séru (Racek, 2006).

1.4.7 Inzulinu podobný růstový faktor (IGF-I)

Inzulinu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor I; IGF-I) je peptid o velikosti asi 7 kDa strukturně podobný inzulinu. Má mitogenní a metabolické účinky na růst, přežití a diferenciaci množství buněk a tkání. Jeho sekrece je úzce spjata s růstovým hormonem, který je tvořen předním lalokem hypofýzy a má anabolický efekt na kostní tkáň a to jak přímo, tak prostřednictvím IGF-I.

IGF je produkován převážně játry a negativní zpětnou vazbou ovlivňuje sekreci samotného růstového hormonu. Kromě produkce v játrech, je IGF tvořen také přímo v tkáních, např. ve svalových buňkách, ale i v kostní tkáni a mozku. Oba dva jsou tedy růstovými faktory, které působí jako hormon, tedy systémově anebo lokálně, jako autokrinní/parakrinní faktor (Cohick a Clemmons, 1993; Stewart a Rotwein, 1996). IGF působí přes své receptory a je závislý na proteinech vázajících IGF (IGFBPs, IGF binding proteins). Rozeznáváme 6 IGFBPs s různou funkcí a mechanismem působení, od jednoduchých nosičů po účinné regulátory působení IGF (Mohan a Baylink, 2002). Exprese mRNA IGFBP-2 v osteocytech je zvyšována mechanickou zátěží (Reijnders *et al.*, 2007) nebo po mechanické stimulaci pomocí zátěže u potkanů (Bravenboer *et al.*, 2001).

Růstový hormon buď přímo či prostřednictvím IGF-I stimuluje proliferaci osteoblastů, tvorbu osteoprotegerinu a expresi kolagenu v osteoblastech (Canalis *et al.*, 1995). IGF-I pravděpodobně podporuje osteoklastogenezi tvorbou RANK-L (ligand pro aktivátor receptoru pro nukleární faktor kappa-B; NF- κ B) v osteoklastech (Mochizuki *et al.*, 1992). Tvorba IGF-I přímo v kostní tkáni, konkrétně v osteoblastech, je stimulována parathormonem (Minuto *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2000), hormonem štítné žlázy a estrogeny (Huang *et al.*, 2000) a inhibují ji glukokortikoidy (Delany *et al.*, 2001), TGF- β a kortizol.

V experimentech se zvířaty bylo zjištěno, že systémový IGF-I ovlivňuje spíše kortikální část kosti a lokální IGF-I spíše trabekulární kostní tkáň (Giustina *et al.*, 2008).

Stanovení hladiny IGF-I je velmi cenným diagnostickým prvkem, neboť jeho sekrece neprobíhá v pulsech a s věkem klesá. Je využíván pro diagnostiku akromegalie a gigantismu (Racek, 2006).

1.4.8 Kostní morfogenetické proteiny (BMPs)

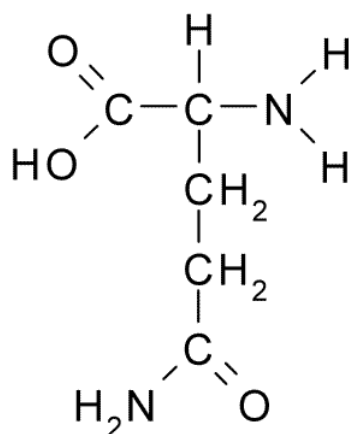
Kostní morfogenetické proteiny (BMPs, bone morphogenetic proteins) jsou součástí nadrodiny růstových faktorů beta (TGF- β , transforming growth factor beta) a hrají roli v embryonálním vývoji, buněčné diferenciaci a funkci osteoblastů. BMPs indukují diferenciaci mesenchymálních buněk směrem k buňkám osteoblastické linie, čímž podporují diferenciaci osteoblastů, jejich zrání a funkci. Mimo to indukují BMPs ještě enchondrální osifikaci a chondrogenezi. Následkem vlivu BMPs na linii osteoblastů je podpora osteoklastogeneze, procesu, který je úzce spjatý s osteoblastogenezí. Pro udržení rovnováhy v kostní remodelaci je nutná zpětná vazba ovlivňující aktivitu BMPs.

Funkce BMPs je spojena i s dalšími růstovými faktory. Stimulací diferenciaci buněk osteoblastické linie se zvyšuje množství cílových buněk pro IGF-I, tedy zralých osteoblastů. BMPs také reguluje hladinu IGFBPs, které jsou syntetizovány v osteoblastech a regulují aktivitu IGF (Canalis *et al.*, 2003).

BMPs se váže na receptory IGFBP I a II, jejichž signál je zprostředkován fosforylací transkripčního faktoru Smads. Signalizace BMPs je regulována na mnoha úrovních, jak extracelulárně na membráně, tak intracelulárně (Itoh *et al.*, 2000).

1.5 Aminokyseliny

1.5.1 Glutamin



Obrázek 1: Chemický strukturní vzorec glutaminu

Extreme Longevity [online]. c2011, [cit 2013-01-27]. Dostupné z: <http://extremelongevity.net/2012/03/15/glutamine-supplementation-protects-brain-cells-and-dna/>

Suplementace glutaminem a jinými aminokyselinami, především větvenými (valin, leucin a izoleucin) se využívá nejen k regeneraci a růstu svalové hmoty nejčastěji v kulturistice (Shimomura *et al.*, 2006) nebo v atletice (Gleeson, 2005), ale také k léčbě závažných proteokatabolických stavů, jakou jsou popáleniny, krvácení, sepse (Newsholme a Hardy, 1997) a též u pacientů po transplantaci kostní dřeně (Ziegler *et al.*, 2002; Mora Lde *et al.*, 2002).

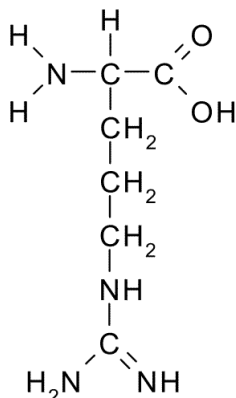
Glutamin (Obrázek 1) je aminokyselina neesenciální, která je součástí proteinů lidského těla a podílí se na udržování dusíkové rovnováhy v organismu a má také významnou funkci při detoxikaci amoniaku. Zapojením do metabolismu amoniaku má glutamin významnou úlohu při udržování acidobazické rovnováhy organismu (Holeček, 2006). Glutamin tvoří přibližně 20 % volných aminokyselin v plazmě a více než 50 % aminokyselin v kosterním svalstvu a jeho zdrojem jsou také plíce.

Cestu odstranění amoniaku vazbou na glutamát za vzniku glutaminu využívají hlavně buňky mozku, dále také kosterní svaly a játra. Reakce je katalyzovaná glutaminsyntetázou v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) a probíhá v mitochondriích. Vzniklý glutamin je využíván následně jako zdroj dusíku či energie. Krví se dostává do střeva, kde je přeměněn na alanin, nebo do ledvin, jater, lymfocytů, monocytů a nervové tkáně, kde vzniká, působením glutaminázy na vnitřní mitochondriální membráně, opět glutamát a amoniak. Cestou přes glutamát je glutamin také prekurzorem pro syntézu antioxidantu glutathionu, který chrání buňky před působením volných radikálů. (Cao *et al.*, 1998; Mora Lde *et al.*, 2002). Vzniklý glutamát je degradován na 2-oxoglutarát a na amoniak enzymem glutamátdehydrogenázou za přítomnosti NADP⁺ (Holeček, 2006).

Glutamin je syntetizován v kosterním svalu též z větvených aminokyselin (BCAA) (Holeček, 2006).

U stavů se zvýšenou tvorbou cytokinů se hlavním místem využití glutaminu stává imunitní systém, kde slouží jako prekurzor pro purinové a pyrimidinové kruhy nukleotidů a nukleových kyselin jako je ATP (Wilndmueller a Spaeth, 1974). U výše zmíněných stavů (popáleniny, sepse) převyšuje utilizace glutaminu jeho syntézu, dochází k aktivaci proteolýzy a oxidaci BCAA jak v kosterním svalstvu, tak v buňkách imunitního systému, a následně pak klesá jeho koncentrace v kosterním svalu a tělních tekutinách (Karinch *et al.*, 2001).

1.5.2 Arginin



Obrázek 2: Chemický strukturní vzorec argininu

Wikimedia Commons [online]. c2005, poslední revize 15. 8. 2009 [cit. 2014-07-23]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arginine.png>

Arginin (Obrázek 2) je nejbazičtější aminokyselinou, která je prekurzorem pro syntézu řady významných látek, jako je oxid dusnatý (NO), kreatin, agmatin, polyaminy spermidin a spermin. Má ale i řadu regulačních funkcí, jako aktivátor N-acetylglutamátsyntázy, stimuluje sekreci růstového hormonu, prolaktinu, luteinizačního hormonu a inzulinu. Jeho zdrojem jsou bílkoviny, jak exogenní tak endogenní.

Arginin je podmíněně esenciální, což znamená, že je nezbytný u dětí v období růstu (fetální vývoj a novorozenci), v době zvýšené aktivity fagocytů a při spermatogenezi. V ostatních situacích je ho tvořen dostatek v močovinovém cyklu. Arginin může vznikat také z glutamátu. Degradace argininu probíhá cestou přes glutamát na 2-oxoglutarát (Holeček, 2006).

Suplementace argininem má pozitivní vliv na proteinovou bilanci, regeneraci poškozené tkáně a imunitní systém (Holeček, 2006).

Přibližně před 25 lety se arginin stal velmi populární mezi sportovci pro své pozitivní účinky na zvýšení fyzické síly a oddálení svalové únavy během fyzické činnosti. Bylo provedeno mnoho studií sledující účinek podávání samotného argininu nebo jeho kombinace s glycinem nebo α -ketoglutarátem na svalovou sílu a výdrž v době fyzické aktivity (Buford a Koch, 2004; Stevens *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2006). Ve studii Lewis *et al.* (1999) byly sledovány vedlejší účinky vzhledem k dávce podávaného argininu. Při množství více jak 21 g denně se objevil průjem, únava

a krvácení z nosu, při dávkách 30 g si dobrovolníci stěžovali na průjmy, bolesti hlavy a pocit sucha v ústech. Při nižších dávkách nebyly tyto vedlejší účinky pozorovány.

Ve studii s mladými sportujícími studenty (Imanipour *et al.*, 2012) bylo zjištěno, že podávání samotného L-argininu, ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou suplementovanou BCAA, potlačuje únavu během fyzické aktivity tím, že zasahuje do metabolismu amoniaku. Nebyl prokázán vliv suplementace L-argininem na koncentraci laktátu v séru jak ve srovnání se skupinou na BCAA, tak kontrolou.

Suplementace argininem během fyzické aktivity vedla ke zvýšení koncentrace růstového hormonu (Colombani *et al.*, 1999). Při suplementaci v klidu k tomuto nárůstu však nedošlo (Fogelholm *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1993).

Intravenózní akutní podání argininu za klidu vede k periferní vazodilataci, inhibici agregace krevních destiček, zlepšení vazodilatační odpovědi závislé na endotelu, k redukci adheze makrofágů k endotelu a k redukci vzniku aterosklerózy. Arginin podávaný intravenózně snižuje krevní tlak a kompenzačně zvyšuje tepovou frekvenci (McConell, 2007), dále zvyšuje sérovou koncentraci inzulínu, glukagonu, růstového hormonu, prolaktinu, adrenalinu a noradrenalinu.

Naproti tomu arginin podávaný akutně orálně má mnohem menší účinky, což je pravděpodobně způsobeno jeho nízkou biologickou dostupností, neboť část ho je metabolizována již v intestinální mukóze. Podání argininu ve stejné dávce jako u vysokoproteinového jídla (1 mmol argininu/kg tělesné hmotnosti), nevede ke zvýšení koncentrace inzulínu v plazmě (Bode-Böger *et al.*, 1998).

Chronické orální podávání argininu snižuje rizika kardiovaskulárních onemocnění, zvyšuje plazmovou koncentraci L-argininu a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) (Pallosi *et al.*, 2004). U osob s kardiovaskulárním onemocněním asociovaným s endoteliální dysfunkcí zlepšuje suplementace argininem kapacitu při aerobním cvičení pravděpodobně zvýšením produkce NO. U zdravých osob je tento účinek minimální.

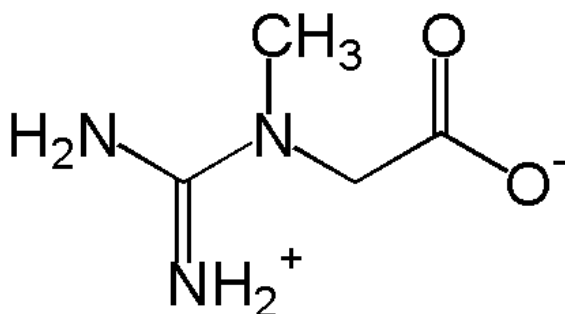
Bylo ovšem provedeno jen velmi málo studií sledující efekt suplementace argininem na kost a kostní metabolismus.

NO, který vzniká z argininu působením NOS (syntáza NO), je významná signalizační molekula. Přítomnost NOS byla prokázána také v kostech (Helfrich *et al.*, 1997). Některé studie prokázaly, že vysoké hladiny NO vedou ke kostní resorpci jakožto následek zánětlivého procesu. Naopak nízké hodnoty potlačují resorpci kosti a aktivují kostní novotvorbu (van't Hof a Ralston, 2001). NO může být tvořen také

tzv. NO-donory, kteří jsou účinnými vasodilatátory, např. nitroglycerin. Hurson *et al.* (1995) ve své studii prokázal, že suplementace argininem vede ke zvýšení sérové koncentrace IGF-I, který ovlivňuje diferenciaci osteoblastů a jeho koncentrace koreluje s hodnotou BMD.

Ve studii Baecker *et al.* (2005) byl zdravým postmenopauzálním ženám podáván orálně arginin (L-arginin hydrochlorid). Ve studii ovšem nedošlo ke změnám v koncentracích kostních markerů, hodnotách BMD, ani v obsahu minerálu v kosti. Autoři se domnívají, že tento negativní výsledek je způsoben formou podávaného argininu, jeho příliš pevnou chemickou vazbou na hydrochlorid.

1.5.3 Kreatin



Obrázek 3: Chemický strukturní vzorec kreatinu

Fitness produkty.cz. [online]. c2008, [cit. 2014-08-13]. Dostupné z: <<http://www.fitness-produkty.cz/clanky/kreatiny/kreatin.html>>

Kreatin (Obrázek 3) je dusíkatá látka, jejíž nejvyšší koncentrace je ve svalech. Kreatin je neesenciální, vzniká z argininu, glycinu a methioninu cestou přes ledviny, kde vzniká guanidinacetát, a následně dochází v játrech k metylaci za vzniku kreatinu, který je poté uvolněn do krve. Zdrojem kreatinu z potravy je maso.

Kreatin je v organismu přeměňován přes kreatinfosfát na kreatinin, ten se jako odpadní látka vylučuje ledvinami. Stanovení kreatininu v moči slouží jako ukazatel funkce ledvin a k hodnocení množství svalové hmoty.

Hlavní funkcí kreatinu v organismu je, že slouží jako zdroj energie pro mozek a svaly ve formě ATP. Zdrojem fosfátu pro tvorbu ATP je kreatinfosfát, který je v organismu uchovávan do zásoby a při potřebě energie je velmi rychle uvolněn. Jeho zásoby nejsou příliš velké a stačí na pokrytí energie nutné ke krátkodobému výkonu např. ke krátkému běhu. Reakce je reverzibilní a za její průběh je zodpovědná kreatinkináza. Bylo prokázáno, že kreatinkináza hraje energetickou roli také v kostní tkáni (Gerber *et al.*, 2005).

Pro své vlastnosti a funkci v organismu je kreatin vyhledávaným potravinovým doplňkem sportovců. Využití našel i v medicínské oblasti na podporu regenerace při nervosvalových poraněních (Kley *et al.*, 2013).

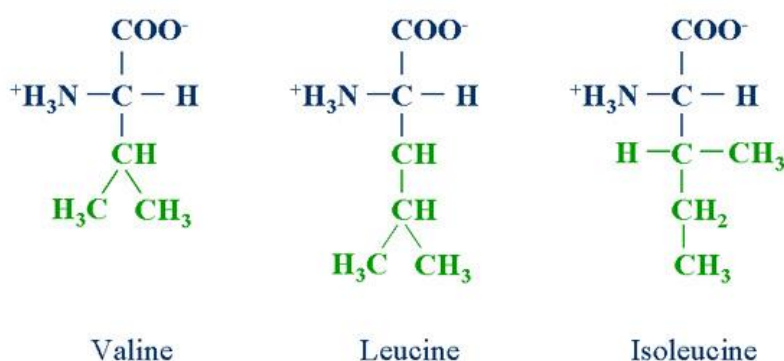
U *in vitro* studií bylo zjištěno, že aktivita kreatinkinázy se zvyšuje vlivem IGF-I a PTH, faktorů stimulujících růst kostní hmoty, diferenciaci, metabolickou aktivitu osteoblastů a kostní mineralizaci (Gerber *et al.*, 2005).

Antolic *et al.* (2007) ve své studii zjistil, že suplementace kreatinem zvyšuje BMD v oblasti bederních obratlů, ale jen mírně v oblasti femuru. Suplementace kreatinem ovlivňuje také biomechanické vlastnosti - zvyšuje odolnost femuru v ohybu u zdravých potkanů. Zjištěn byl také větší průměr femuru v místě zlomení ve srovnání s kontrolou (Antolic *et al.*, 2007).

Ve studii se spontánně hypertenzními potkany nebyl prokázán příznivý efekt suplementace kreatinem na kostní hmotu (Alves *et al.*, 2012).

Pozitivní vliv na kostní hmotu měla suplementace kreatinem u Duchennovy svalové dystrofie (Louis *et al.*, 2003) a u starších trénujících osob (Chilibeck *et al.*, 2005) a má také pozitivní vliv na hodnoty cholesterolu, na paměť a inteligenci (Rae *et al.*, 2003).

1.5.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem



Obrázek 4: Chemický strukturní vzorec valinu, leucinu a izoleucinu

Cardiff sports nutrition [online]. c2013, [cit. 2013-10-16]. Dostupné z: <http://www.cardiffsportsnutrition.co.uk/blog/what-are-branched-chain-amino-acids-bcaas/>

Valin, leucin a izoleucin (Obrázek 4) jsou esenciální aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA, větvené aminokyseliny, branched-chain amino acids), které jsou zdrojem dusíku při syntéze alaninu, kyseliny glutamové a glutaminu

ve svalech. Přesunem aminoskupiny z BCAA na alfa-ketoglutarát vzniká kyselina glutamová. Kyselina glutamová může být zdrojem aminoskupiny pro tvorbu alaninu z pyruvátu nebo se stává zdrojem pro syntézu glutaminu cestou přes oxalacetát za vzniku aspartátu. Aspartát vzniklý z glutamátu je využit pro syntézu adenosinmonofosfátu (AMP). Deaminací adenosinu na inosin se uvolňuje amoniak, který je nutný pro tvorbu amidové skupiny glutaminu.

Degradace BCAA zahrnuje dva významné enzymy - BCAA aminotransferázu a BCKA dehydrogenázu. Z aminokyselin vznikají ketokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCKA, branched-chain ketoacids) transaminací pomocí BCAA aminotransferázy. Tento děj je vratný a např. játra jsou schopna resyntetizovat BCKA zpět na BCAA. K tomuto ději dochází u stavů jako je sepsa a trauma, kde hrozí nadměrné ztráty esenciálních BCAA. V těchto situacích dochází k resyntéze BCAA také v tukové tkáni a srdeční svalovině. Druhým krokem katabolismu BCAA je nevratná oxidační dekarboxylace za vzniku derivátů koenzymu A. Katabolismus BCAA je zahájen v tkáních, v kosterním svalu a myokardu, protože je zde nejvyšší aktivita aminotransferázy. Naopak aktivita dehydrogenázy je nejvyšší v játrech a nízká ve svalech (Holeček, 2006).

Pro svůj stimulační účinek na proteosyntézu jsou suplementy obohacené o BCAA často doporučovány u řady proteokatabolických stavů, jako jsou sepsa, popáleniny, polytraumata, renální insuficience, poškození jater a nádorová onemocnění.

Zdrojem BCAA (valinu, leucinu, a izoleucinu) je maso, mléčné výrobky a luštěniny. Syrovátka (whey protein), která vzniká při srážení mléka, kdy se odděluje kasein a tuky, jich obsahuje přibližně 26 %. Kromě BCAA obsahuje také vysoký podíl dalších bílkovin a to převážně laktalbumin.

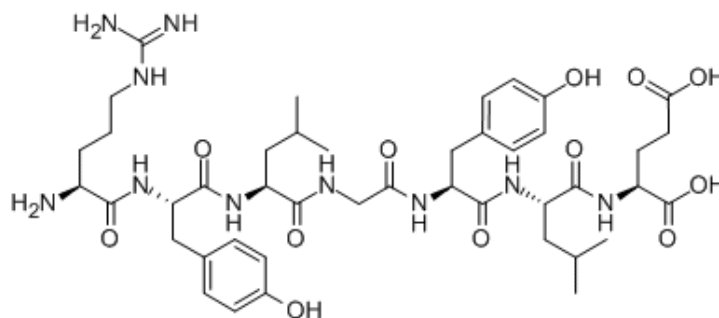
Syrovátka má řadu příznivých zdravotních vlivů: regulace hypertenze, posilování imunity, zvýšení antioxidační aktivity, zmírnění metabolického stresu, zlepšení stavu svalové hmoty a fyzické síly, ovlivnění absorpce živin a v dnešní době nejvyhledávanější účinek - regulace hmotnosti a regulace ukládání tuku u obézních dospělých (Baer *et al.*, 2011), u zdravých potkanů (Zhou *et al.*, 2011) i u potkanů se sníženou citlivostí k inzulínu (Belobrajdic *et al.*, 2004).

Syrovátka má pozitivní vliv na kostní sílu. Podporuje kostní formaci u mladých zvířat, tím že stimuluje osteoblasty a inhibuje osteoklasty *in vitro* (Takada *et al.*, 1997). Navíc syrovátka potlačuje s věkem spojenou kostní ztrátu u mužů i u žen (Hannan *et al.*,

2000) a zlepšuje stav kostní hmoty u pacientů s již prodělanou zlomeninou krčku femuru, zvyšuje koncentrace IGF-I a zkracuje dobu hospitalizace (Schürch *et al.*, 1998).

Z těchto důvodů se suplementace syrovátkovými proteiny (více jak 80% proteinové koncentráty) stala velmi populárními mezi atlety a kulturisty.

1.5.5 Kasein



Obrázek 5: Chemický strukturální vzorec kaseinu

Chemical Book [online]. c2010, [cit. 2013-03-13]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9694673.htm

Kasein (Obrázek 5) je mléčný protein oddělující se při srážení mléka spolu s tuky od syrovátky. Kasein je tvořen vysokým podílem prolinu a hydrofobních aminokyselin, jeho sekundární a terciální struktura není pevná, protože není zpevněna disulfidickými můstky. Kasein je významným zdrojem aminokyselin, vápníku a fosfátů. Kasein vytváří v žaludku fosfopeptidy, které mají strukturu gelu, který umožňuje jeho pomalé trávení, proto je dlouhotrvajícím zdrojem energie. Pomalé trávení kaseinu je používáno u trénujících sportovců, využívá se jeho anti-katabolického účinku, vede k dlouhodobé pozitivní dusíkové bilanci a tím chrání svaly před poškozením. Kasein a jeho sloučeniny se využívají v potravinářství jako přídatné látky (např. plnění párků, práškové nápoje, náhražka smetany atd.).

Kaseinové fosfopeptidy vytvořené v žaludku v průběhu trávení podporují absorpci vápníku a tím stimulují mineralizaci kostí. Tento účinek byl prokázán *in vitro* i u zvířecích modelů (Scholz-Ahrens a Schrezenmeir, 2000). Nadměrné vstřebávání vápníku z důvodů chronické suplementace kaseinem vede k aktivaci osy parathormon-vitamín D a následně k potlačení vstřebávání vápníků ze střeva (Zhao *et al.*, 2005). Dochází tedy k adaptaci organismu na dlouhodobou suplementaci kaseinem. V některých studiích, jak u lidí (Teucher *et al.*, 2006), tak u potkanů (Brommage *et al.*, 1991), však tento účinek prokázán nebyl.

1.6 Nedostatek nebo nadbytek proteinů v potravě

Příjem proteinů hraje ve výživě organismu velmi významnou roli. Proteiny v potravě mají jednoznačně pozitivní vliv na svalovou sílu a tím zlepšují pohybové schopnosti. A pohyb, jak je známo, je obecně velmi prospěšný pro BMD. Již 4 týdny bez pohybu mají až destruktivní vliv na kostní hmotu (Geinoz *et al.*, 1993; Bonjour, 2005).

Ze systematického přehledu a metaanalýzy o vlivu příjmu proteinů potravou na stav kostí ze studií na zdravých dospělých osobách vyplývá, že existuje pozitivní korelace mezi příjmem proteinů a BMD, BMC téměř ve všech částech kostry a redukcí hladin markerů kostní resorpce. Ovšem z důvodu absence dlouhodobé intervenční studie zůstává nezodpovězenou otázkou ovlivnění rizika fraktur příjmem proteinů (Darling *et al.*, 2009).

Negativní vliv na stav kostní hmoty může mít jak dieta se sníženým příjmem proteinů, tak i jejich nadměrný příjem. Otázkou zůstává, kde se nachází hranice mezi prospěšným a škodlivým účinkem dietního proteinu na kost.

Deficit proteinů v potravě způsobuje prudkou a výraznou změnu kostní hmoty a mikroarchitektury, následkem je pokles kostní síly (Kerstetter *et al.*, 2003). Tyto změny jsou klíčové pro rozvoj osteoporózy. Deficit proteinů, spolu s nedostatkem vápníku a vitamínu D jsou významnými faktory ovlivňujícími rozvoj osteoporózy u starších osob. Za hlavní mechanismus ovlivnění kostní síly nedostatkem proteinů je považován pokles plazmatických hladin IGF-I (Ammann *et al.*, 2002). IGF-I je jedním z faktorů, kterým se projevuje anabolický efekt aminokyselin na organismus. IGF-I zvyšuje kostní hmotu stimulací aktivity osteoblastů (Canalis *et al.*, 1995) a může také podporovat mineralizaci kostní matrix částečně tím, že zvyšuje vstřebávání vápníku (Kerstetter *et al.*, 2003). Jedním z nečekaných nálezů ve studii Kerstettera *et al.* (2003) byla sekundární hyperparathyreóza i přes dostatečný příjem vápníku v potravě. Zůstává tedy otevřená možnost, že nízkoproteinová dieta má negativní účinky na metabolismus vápníku ve střevech a/nebo v kostech. (Kerstetter *et al.*, 2003).

Nadměrný příjem proteinů má ale také negativní vliv na kost a to z důvodu tvorby kyselin neboli acidogenity. Acidogenita vede ke zvýšenému odbourávání kosti (Weiss *et al.*, 1981). Pokles pH organismu je výsledkem oxidace síry aminokyselin proteinů a tím dochází k narušení rovnováhy mezi osteoblasty a osteoklasty a zároveň dochází ke zvýšení exkrece vápníku močí, k hyperkalcii. Kostí fungují jako pufrovací systém regulující acidobazickou rovnováhu pomocí uvolňování vápníku (Mardon *et al.*,

2008). Při nižším pH prostředí se zvyšuje rozpustnost kalcium-fosfátových solí, včetně hydroxyapatitu, tím se zvyšuje riziko osteoporotické zlomeniny (Bonjour, 2005). Dochází tak k přímému fyzikálně-chemickému uvolnění zásaditých komponent z kostního minerálu, nebo nepřímo k aktivaci osteoklastů. Tento model ovšem nebere v potaz biochemické a fyziologické schopnosti organismu udržet koncentraci protonů v požadovaných koncentracích.

Zvířecí proteiny, na rozdíl od rostlinných, obsahují větší množství aminokyselin obsahujících síru, methionin a cystein. Zdrojem síru obsahujících aminokyselin jsou nejen živočišné proteiny, ale také oříšky a cereálie. Oxidace methioninu a cysteinu na H_2SO_4 v játrech a následné snížení pH krve je považováno za primární mechanismus, který zvyšuje kostní resorpci a vede k hyperkalcii. Tento efekt je ovšem ovlivněn přítomností zásad v potravě (K, Na, Ca, Mg), které pH snižující efekt dietních proteinů neutralizují (Ginty, 2003). Vzniklá hyperkalcie, často doprovázená hypercitraturií, má negativní vliv na funkci ledvin tím, že přispívá k tvorbě vápenatých ledvinových kamenů (Pak *et al.* 2008). Zvýšená kalcie se nemusí nezbytně rovnat ztrátám kalcia, které odpovídají negativní kalciové bilanci. Znamená to pouze, že příjem kalcia do extracelulárních prostorů je vyšší než do střeva nebo kosti.

Vlivem proteinů a aminokyselin na stav kostní hmoty se zabývalo jen několik málo studií a často došly k protichůdným závěrům. Negativní vliv na stav kostního metabolismu měl jak nedostatek, tak nadbytek proteinů v dietě a to nejen u zdravých, ale i nemocných jedinců, lidí i zvířat.

1.7 Hladovění

Hladovění je stav organismu, kdy organismus nepřijímá žádnou potravu a ke správnému fungování využívá svých vlastních zásob. Hladovění se dělí do třech fází: fáze časná, fáze adaptace a fáze terminální.

Časná fáze hladovění neboli glukoneogenetická fáze, nastává během 2-3 dnů od začátku hladovění. Jedná se o stav, kdy se organismus snaží za každou cenu udržet konstantní hladinu glukózy. V játrech probíhá nejprve glykogenolýza a glukoneogeneze. Ovšem zásoby glykogenu jsou v játrech omezené a proto následně převažuje glukoneogeneze z aminokyselin vzniklých při proteolýze ve svalích nad glykogenolýzou. Ve svalové tkáni vzniká pyruvát, ze kterého vzniká alanin a ten je následně zdrojem pro syntézu glukózy v játrech. Glutamin vzniklý ve svalích se stává zdrojem energie pro střeva a následně z něho vzniká alanin, který je opět v játrech

použit pro syntézu glukózy. V tukové tkáni dochází k lipolýze, uvolňují se mastné kyseliny, ty se stávají zdrojem energie pro myokard, kosterní svalstvo, játra a ledviny, a glycerol, který slouží v játrech jako substrát pro glukózu. Zvyšuje se tvorba ketoláték, které vedou ke zvýšenému vylučování dusíkatých látek močí.

Fáze adaptace neboli „proteiny šetřící“ fáze, je stav, kdy se snižuje obrát proteinů, tedy proteolýza i proteosyntéza. Organismus se na tento stav adaptuje zpomalením metabolického obrátu a snížením energetických potřeb. Významným zdrojem energie se v této fázi stávají ketolátky vznikající v játrech z mastných kyselin a zdrojem pro glukoneogenezi se stává glycerol. Nadbytečně vzniklý amoniak, který vede k rozvoji acidózy, je v játrech využíván pro syntézu glutaminu a tím se snižuje syntéza močoviny a její vylučování močí.

Po 7-8 týdnech úplného hladovění nastává fáze terminální. Zásoby lipidů jsou vyčerpány a zdrojem energie se stávají bílkoviny. Aktivuje se proteokatabolismus, dochází ke ztrátám svalové hmoty a potlačení imunitních reakcí. Výsledkem je narušení funkcí na úrovni buněk a následně smrt (Holeček, 2006).

McCue (2010) se ve své práci věnoval vlivu hladovění na organismus různých živočichů. Ve své práci vychází ze tří výše popsaných fází hladovění. První fáze začíná ihned po strávení požitého jídla, kdy nastupuje pocit hladu. Tehdy je čerpána energie z glukózy. Ve druhé fázi, tj. po 12 hodinách hladovění, je polovina energie získána z volných mastných kyselin spíše než glukózy. Uvolňuje se glycerol a volné mastné kyseliny pro glukoneogenezi (Reshef et al., 2003) a pro β -oxidaci (McCue, 2010). Ve třetí fázi již nestačí ketolátky k udržení bazálního metabolismu a začne se metabolizovat svalová tkáň (McCue, 2010; Wang *et al.*, 2006).

Bylo prokázáno, že během hladovění se zvyšují počty receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory gamma (PPAR γ , peroxisome proliferator-activator receptor), což vede diferenciaci prekurzorových buněk spíše k adipocytům než k osteoblastům (Gimble *et al.*, 1996; Lecka-Czernik *et al.*, 1999). Dochází také k poklesu sérové koncentrace estrogenu a IGF-I. Cestu IGF-I v játrech primárně tlumí fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21, Fibroblast growth factor-21), který stimuluje oxidaci mastných kyselin v játrech, ketogenezi, citlivost buněk na inzulin, blokuje efekt STH a je příčinou úbytku kostí (Zhang *et al.*, 2012).

Svou roli by během hladovění mohly hrát i reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species). Názory na jejich roli během hladovění jsou ale nejednoznačné. Hladověním je stimulována tvorba ROS, především peroxidu vodíku

(H₂O₂). Přičemž peroxid vodíku je esenciální pro autofagii při hladovění (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Vysoké koncentrace peroxidu vodíku vedou k buněčnému poškození, ale nízké koncentrace mají důležitou roli jako signalizační molekula (Veal *et al.*, 2007). Naopak Desideri *et al.* (2014) tvrdí, že hladovění snižuje hladiny ROS, což brání autofagii a tím se zvyšuje odolnost při hladovění.

Při hladovění dochází k poklesu množství minerálů v tělesných tekutinách. Minerály, především vápník jsou doplňovány odbouráváním kostí. Vápník je nezbytný pro fyziologické děje v celém organismu, proto je při jeho nedostatku stimulována kostní resorpce s jeho uvolněním z kostního hydroxyapatitu (Potts, 2005).

Dalším možným důvodem úbytku kostní hmoty při hladovění je mechanická teorie (Devlin, 2011). Pokud dojde k poklesu tělesné hmotnosti, pak je i méně zatížena kostra a může se spustit kostní resorpce, spíše endosteálně, kde je nejméně zatížena (Frost, 1987; Frost, 2003).

Můžeme se ptát, jak dlouho musí být snižená tělesná hmotnost, aby se z tohoto důvodu začala kostní tkáň odbourávat. Stačí jí dny, hodiny?

Ženy s mentální anorexií, tedy ženy s dlouhodobým hladověním (i když s mizivým příjmem potravy) mají nízké hodnoty kostní hmoty, nízkou novotvorbu kostí a vysoké hodnoty kostní resorpce, nízké hladiny IGF-I i estrogenu (Abella *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2006; Misra a Klibanski, 2006; Misra a Klibanski, 2010). Podobné změny našel Devlin *et al.* (2010) i u myši.

1.8 Železo

Železo patří mezi mikrobiogenní neboli stopové prvky. Mikrobiogenní prvky se v organismu vyskytují v mikromolárních koncentracích a přesto jsou pro organismus esenciální. Železo je významnou součástí řady enzymů, např. prolyl a lysyl hydroxylázy, 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylázy, ribonukleotid-reduktázy a řady dalších.

Nadbytek železa je pro organismus toxický a nedostatek naopak může vést ke vzniku řady onemocnění. Rovnováha železa v organismu je udržována pouze regulací absorpce z trávicího traktu. Organismus nedokáže odstranit nadbytečné železo jeho vyloučením, může pouze snížit jeho absorpci ve střevě. Proto musí být metabolismus železa, od jeho transportu přes buněčné membrány, po distribuci v organismu a uchovávání v intaktní formě, dobře fungujícím mechanismem.

Nadbytek železa je pro organismus vysoce toxický z důvodu tvorby volných radikálů Fentonovou reakcí (Isomura *et al.*, 2004; Matshushima *et al.*, 2001). Mezi stavy s nadbytkem železa v organismu patří talasémie, srpkovitá anémie, africká sideróza, hereditární hemochromatóza (HHE), dále kouření, alkoholismus, HIV infekce a v neposlední řadě také zástava menstruačního krvácení. Až u 50 % těchto pacientů, kteří mají v organismu vyšší koncentrace železa, byla zjištěna osteoporóza (Weinberg, 2006).

Flebotomie, neboli odběr 250 až 500 ml krve, je velmi efektivní a již přes 50 let používaný přístup v léčbě chorob se zvýšenou zátěží železem, jako je např. hemochromatóza (Adams a Barton, 2010).

Tato terapie stimuluje erytropoézu a mobilizuje železo ze zásobních míst. Snížení koncentrace železa redukuje potenciál pro vznik tkáňového poškození indukovaného železem, jako je jaterní fibróza, cirhóza a karcinom jater. Vysoká frekvence opakovaných odběrů krve (4krát ročně) vede k poklesu zásob železa a s tím souvisejícího poklesu oxidačního stresu (Zheng *et al.*, 2005).

Kromě těchto léčebných forem se s flebotomií setkáváme u dobrovolných dárců krve, kteří jsou naopak ohroženi nedostatkem železa v organismu (Cançado *et al.*, 2001), a proto jsou často, převážně premenopauzální ženy, železem suplementováni.

Chronické ztráty krve mohou ale z důvodu neustálé stimulace stromálního a hematopoetického systému vést k jeho vyčerpání a stát se tak primárním faktorem rozvoje osteoporózy (Gurevitch *et al.*, 2007).

Buňky se liší svoji citlivostí k železu. Osteoblasty, které reprezentují kostní novotvorbu, jsou extrémně citlivé k přítomnosti železa (Weinberg, 2008). Železo jejich funkci potlačuje. Naopak osteoklasty, buňky resorbující kostní tkáň, jsou schopné fungovat správně i v přítomnosti nadbytku železa. Mezi další patří buňky přední hypofýzy, které jsou extrémně citlivé k nadbytku železa, což vede k nedostatku gonadotropinů s následným rozvojem osteoporózy (Weinberg, 2008).

2. Cíle disertační práce

Cílem mé disertační práce bylo sledovat vliv výživy a vybraných stavů, jako je dlouhodobé omezení příjmu potravy, krátkodobé hladovění a opakované odběry krve, na mechanické vlastnosti kostní tkáně a změny kostního metabolismu. Především jsem se zajímala o vliv železa, jak jeho nadbytku, tak i jeho nedostatku, dále o jednotlivé aminokyseliny a o běžně dostupnou bílkovinu – kasein.

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

U všech dietních skupin jsem se zabývala:

- zavedení metodiky testování mechanických vlastností kostní tkáně 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
- změření kostní minerální hustoty (BMD) potkana pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie
- vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné svalové a tukové tkáně) potkana
- preparaci femurů a tibií z potkana *post mortem*
- příprava homogenátů z kostní tkáně

3. Experimentální část

3.1 Experiment s podáváním aminokyselin a bílkoviny

3.1.1 Experimentální dieta

Zvířata byla krmena buď standardní laboratorní dietou (SLD, standard laboratory diet, VELAS, a.s., Lysá nad Labem, ČR), nebo dietou SLD obohacenou o jednotlivé aminokyseliny či o bílkovinu.

Standardní laboratorní dieta (SLD) je kompletní krmná směs pro myši a potkany v SPF (Specific Pathogen Free) chovech. Je vyráběna v Lysé nad Labem firmou VELAS a.s. v kvalitě požadované Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ).

Složení diety je: pšenice, sojový extrudovaný šrot, rybí moučka, pšeničná mouka krmná, kvasnice, kukuřice, pšeničné otruby, oves setý, horkovzdušné úsušky mladé píce vojtešky, uhličitan vápenatý, dihydrogenfosforečnan vápenatý, chlorid sodný, D- a L-methionin, L-lyzin, vitamíny A, D₃, E, síran měďnatý pentahydrát, seleničitan sodný, butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen, etoxyquin.

1 kg SLD obsahuje: vlhkost 12,5 %, dusíkaté látky 24 %, tuk 3,4 %, vláknina 4,4 %, popel 6,8 %, lyzin 14 g, methionin 4,8 g, vápník 11 g, fosfor 7,2 g, sodík 1,8 g, vitamín A 28000 m.j., vitamín D₃ 2200 m.j., vitamín E 100 mg, měď 20 mg, selen 0,38 mg.

Diety se zvýšeným obsahem aminokyselin a proteinů byly připraveny ze sypké diety přidáním příslušných aminokyselin. Zatímco SLD dieta obsahuje 24 % dusíkatých látek, v experimentálních dietách jejich podíl stoupl o 50 %, tedy na 36 % aminokyselin ve volné či vázané formě.

K přípravě diety GLN bylo 16,6 g glutaminu doplněno dietou SLD do 100 g. Dieta obohacená o arginin a kreatin byla připravena ze sypké SLD přidáním L-argininu/kreatinu v čisté formě ve výsledné koncentraci 10 %, tj. 10 g argininu/kreatinu doplněno SLD do 100 g. Dieta BCAA byla obohacená o valin, leucin a izoleucin, tj. 28,7 g směsi BCAA doplněno SLD do 100 g, přičemž směs aminokyselin obsahovala 50 % leucinu, 25 % valinu, 25 % izoleucinu. Dieta KAS neboli vysokoproteinová dieta obsahovala 19,7 g kaseinu doplněno SLD do 100 g.

Premix jednotlivých aminokyselin byl připraven půlhodinovým mícháním s malým množstvím SLD v hnětací nádobě robotu (Kenwood KMM 020 Major

Titanium). Poté byl tento premix vmíchán do celé plánované dávky diety, nejčastěji se jednorázově připravovaly 3 kilogramy diety. Směs připravených diet byla smíchána s malým množstvím vody. Pro usnadnění rozlišení byly jednotlivé směsi obarveny potravinářskými barvami. S využitím kuchyňského robotu na výrobu klobás (Tefal LE HACHOIRE 710) byly vytvořeny válečky, které byly následně sušeny v horkovzdušném sterilizátoru (Stericell BMT Medical Technology s.r.o., Brno, ČR) při teplotě 55 °C po dobu 48 hodin. Takto připravená dieta byla skladována na chladném a suchém místě do spotřebování a to po dobu maximálně 14 dní.

3.1.2 Experimentální zvířata

Protokoly pokusů byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (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).

Zvířata byla chována ve viváriu LFUK-HK. Ve všech experimentech byli použiti zdraví mladí samci potkanů kmene Wistar (Biotest a.s., Konárovice, ČR). Zvířata byla chována v plastových klecích (3-4 kusy/klec) za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22±2 °C, vlhkost vzduchu 30-70 %). S výjimkou vybraných experimentálních skupin, měla zvířata přístup k potravě a vodě *ad libitum* (podle libosti) po celou dobu experimentu. Zvířata byla každý druhý den vážena a byla zaznamenávána spotřeba vody a diety.

3.1.3 Experiment s dietou obohacenou o aminokyseliny a o bílkovinu

V experimentu byli použiti samci potkanů kmene Wistar (Biotest a.s., Konárovice, ČR) ve věku 6 týdnů s tělesnou hmotností 172,6±3,8 g na začátku pokusu. Zvířata byla rozdělena do 8 skupin po 6 zvířatech a krmena *ad libitum* dietami:

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

- 7. skupina **BCAA-R**: krmena dietou BCAA a týden před usmrcením převedena na SLD
- 8. skupina **GLN-R**: krmena dietou GLN a týden před usmrcením převedena na SLD

Po 14 týdnech pokusu byla polovině zvířat odebrána experimentální dieta a byla nahrazena standardní laboratorní dietou (SLD), kterou potkani dostávali až do konce pokusu, tedy po dobu 1 týdne.

Po 15 týdnech příjmu experimentálních diet byla zvířatům odebrána potrava noc před jejich usmrcením. Usmrcení bylo provedeno odběrem krve z bifurkace břišní aorty v celkové anestézii párami éteru ve funkční digestoři.

3.1.4 Experiment s dietou obohacenou o arginin

Potkani s tělesnou hmotností 234 ± 1 g na počátku pokusu 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 % L-argininu *ad libitum*

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

3.1.5 Experiment s dietou obohacenou o kreatin

Potkani s tělesnou hmotností 233 ± 4 g na počátku pokusu 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 v éterové anestézii.

3.1.6 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 krmeny vůči BCAA:

- 1. skupina **SLD-P** krmena SLD v množství, které odpovídalo spotřebě skupiny BCAA

- 2. skupina **KAS-P** krmena KAS v množství, které odpovídalo spotřebě skupiny BCAA

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

3.1.7 Experiment s krátkodobým hladověním

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

- 1. skupina **ST1-S** byla živena standardní laboratorní dietou *ad libitum*
- 2. skupina **ST1-H** byla živena SLD *ad libitum* po dobu trvání pokusu a 24 hodin před usmrcením jí byla odebrána dieta

Potkani s tělesnou hmotností 235 ± 4 g na počátku pokusu 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** byla živena SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum* po dobu trvání pokusu a 24 hodin před usmrcením jí byla odebrána dieta

Potkani s tělesnou hmotností 234 ± 4 g na počátku pokusu 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** byla živena SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum* po dobu trvání pokusu a 24 hodin před usmrcením jí byla odebrána dieta

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

3.2 Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve

3.2.1 Experimentální dieta

Dieta obohacená o železo byla připravena smícháním dvou dílů sypké diety SLD (VELAS, Lysá na Labem, ČR) a jednoho dílu definované standardní laboratorní diety AIN-93 připravené podle dostupné literatury, TestDiet (www.testdiet.com, www.dyets.com), z kaseinu, kukuřičného škrobu, cukru, celulózy, cholin chloridu,

D- a L-methioninu, L-cysteinu, L-argininu, kukuřičného oleje, mixů vitamínů a minerálů (Zivna *et al.*, 2010).

Polovina připravené diety byla zpracována do pelet, které byly následně usušeny v sušičce potravin při teplotě 55 °C. Do druhé poloviny diety byly přimíchány rozdrcené tablety železa (Sorbifer Durules, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapešť, Maďarsko) s obsahem 100 mg Fe²⁺ a 60 mg kyseliny askorbové v jedné tabletě. Byly vytvořeny dvě diety s rozdílným obsahem železa: 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. Aby bylo stejné množství kyseliny askorbové u všech experimentálních skupin, byla do diety fe a SLD přidána navíc samotná kyselina askorbová (Celaskon tablety 250 mg, Zentiva Group a.s., Praha, ČR).

Dieta byla připravena stejným způsobem jako dieta obohacené o aminokyseliny: premix s přídavkem železa byl připraven půlhodinovým mícháním s malým množstvím SLD v hnětací nádobě robotu (Kenwood KMM 020 Major Titanium). Tento premix byl poté vmíchán do celé plánované dávky diety, nejčastěji se jednalo o 3 kilogramy diety. Směs připravených diet byla smíchána s malým množstvím vody, ve které byla rozpuštěna potravinářská barva k barevnému odlišení jednotlivých diet. S využitím kuchyňského robotu na výrobu klobás (Tefal LE HACHOIRE 710) byly vytvořeny válečky, které byly následně sušeny v horkovzdušném sterilizátoru (Stericell BMT Medical Technology s.r.o., Brno, ČR) při teplotě 55 °C po dobu 48 hodin. Takto připravená dieta byla skladována na chladném a suchém místě do spotřebování a to po dobu maximálně 14 dní.

3.2.2 Experimentální zvířata

Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání LFUK-HK a byl v souladu se správnou laboratorní praxí (č. j. 24774/2006-11020).

Dospělí potkani kmene Wistar (Biotest s.r.o, Konárovice, ČR) byli ustájeni za standardních podmínek v plastických klecích. Byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty UK v HK za standardní teploty 22±2 °C, 12 hodin světla a 12 hodin tmy, vzdušné vlhkosti 30-70 %. Skupiny živené SLD pily hořký černý čaj *ad libitum*. Čaj byl uvařen z pitné vody, ze které bylo odstraněno železo průtokem přes filtr (Brita Matra, Německo). Skupiny živené SLD obohacenou o elementární železo pily běžnou pitnou vodu *ad libitum*. Zvířata byla 2x týdně vážena, byla zaznamenávána spotřeba diety

a vody. Všechny operační zákroky byly provedeny ve funkční digestoři v celkové anestezii párami éteru.

Potkani ve věku 8 týdnů byli náhodně rozdělení do 4 skupin po 6 zvířatech o počáteční hmotnosti (315 ± 7 g):

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

Stav obdobný krevním odběrům u dobrovolných dárců krve byl navozen opakovanými odběry (w, blood withdrawal) 1 ml krve na 100 g tělesné hmotnosti z retroorbitálního plexu pomocí heparinizovaných kapilár do Eppendorfových mikrozkušavek s jednou kapkou heparinu (Heparin Léčiva, heparinum natricum 5 000 m.j/ml, Zentiva Group a.s., Praha, ČR).

Po 10 týdnech byla zvířata usmrcena odběrem krve z břišní aorty v éterové narkóze.

3.3 Materiál a metody

3.3.1 Příprava vzorků

Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty. Po usmrcení byly zvířatům vyjmuty vnitřní orgány (játra, slezina, střevo, plíce, srdce a ledviny) k dalším analýzám. Zvířata byla zašita a následně byla změřena kostní minerální hustota. Poté byly zvířatům vyjmuty oba femury, obě tibie a část ocasních obratlů. Vyjmuté kosti byly zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a v plastovém sáčku

zamraženy na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování, kdy byly použity pro biomechanické testování a k přípravě kostního homogenátu.

Krev získaná z bifurkace břišní aorty při usmrcení byla centrifugována při 3500 otáčkách/min. po dobu 10 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ k získání séra. Sérum bylo zamraženo v alikvotech na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy. Krevní sérum bylo použito pro stanovení kostních markerů.

3.3.2 Homogenizace

Homogenáty byly připraveny z proximální části tibie, která byla důkladně očištěna od měkké tkáně. Přibližně 150 mg kostní tkáně bylo rozstříháno na co nejmenší kousky. Kostní tkáň byla třepána při 6500 otáčkách po dobu 20 sekund v 1,5 ml fosfátového pufru (PBS: 9,08g KH_2PO_4 , 11,88g Na_2HPO_4 , 8,75g NaCl; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) s keramickou kuličkou (Lysing Matrix A, MP Biomedicals, LLC, USA) na přístroji MagNA Lyser (Roche Applied Science, Německo). K dokonalé homogenizaci byl tento cyklus opakován 3krát. Po každém cyklu byly vzorky chlazeny po dobu 5 minut v chladičím kruhu (MagNA Lyser Cooling Block), který byl uchován přes noc v mrazicím boxu. Poté byl homogenát přepipetován do zkumavek (Eppendorf) o objemu 1,5 ml, aby byly odstraněny největší zbytky kostní tkáně, a následně centrifugován při 10 000 otáčkách při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl poté zamražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

3.3.3 Biochemická analýza

3.3.1.1 Experiment s podáváním aminokyselin a bílkovin

Metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), která byla použita pro stanovení kostních markerů, je enzymová imunoanalýza, která je založena na reakci antigenu a protilátky, kdy na jeden z nich je navázán enzym a výsledkem je vznik zabarvení.

V séru byly enzymoimunoanalytickou metodou ELISA stanoveny základní markery kostního metabolismu pomocí kitů společnosti Immunodiagnostic Systems Ltd. (Velká Británie): osteokalcin (Rat-MIDTM OC EIA, ng/ml= $\mu\text{g/l}$); aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (Rat/Mouse PINP EIA, $\mu\text{g/l}$); karboxyterminální telopeptid kolagenu I (CTX-I, RatLapsTM EIA, $\mu\text{g/l}$). Mez detekce pro CTX-I je $2\text{ }\mu\text{g/l}$ a $50\text{ }\mu\text{g/l}$ pro OC. Pro PINP není mez detekce výrobcem uvedena.

Koncentrace kostních markerů byla stanovena také v homogenátech kostí pomocí kitů ELISA od společnosti USCNK (Usclife Sciences & Technology Co., Ltd, Wuhan, Čína). Kostní novotvorba byla hodnocena pomocí aminoterminálního propeptidu prokolagenu I, PINP (Rat procollagen I N-terminal propeptide, pg/ml=ng/l), detekční mez byla 31,2-2000 pg/ml a pomocí kostní formy izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP, Rat alkaline phosphatase liver/bone/kidney, ng/ml=μg/l) s detekčním rozmezím 0,78-50 ng/ml. Kostní resorpce byla hodnocena pomocí karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I, CTX-I (Rat Gross linked C-telopeptide of type I collagen (pg/ml=ng/l) s detekčním rozhraním 123,5-10000 pg/ml. Dále byl stanoven kostní morfogenetický faktor 2 (BMP2; pg/ml=ng/l; EIA) a inzulínu podobný růstový faktor (IGF-I, pg/ml=ng/l; EIA).

3.3.1.2 Experiment s podáváním železa a opakovanými odběry krve

◆ Stanovení parametrů krevního obrazu

Z heparinizované krve odebrané při usmrcení z bifurkace břišní aorty byly v Hematologické laboratoři Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK, ČR) stanoveny parametry krevního obrazu, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) a Quickův test (INR, international normalization ratio) na přístroji 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 Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK (ÚKBD) na přístroji Modular Roche (Manheim, Německo). Obsah železa a vápníku v tibií byl změřen metodou atomové absorpční spektrometrie na analyzátoru AAS DUO 280 Z + 240 FS (Varian Australia Pty Ltd, Austrálie) na ÚKBD FN HK. Koncentrace feritinu byla stanovena metodou ELISA (RatFerritin, μg/l, Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA).

◆ Stanovení kostních markerů

V séru byly metodou ELISA stanoveny základní markery kostního metabolismu pomocí kitu společnosti Immunodiagnostic Systems Ltd. (Velká Británie): osteokalcin (Rat-MID OsteocalcinTM, μg/l), aminoterminální propeptid prokolagenu typu I

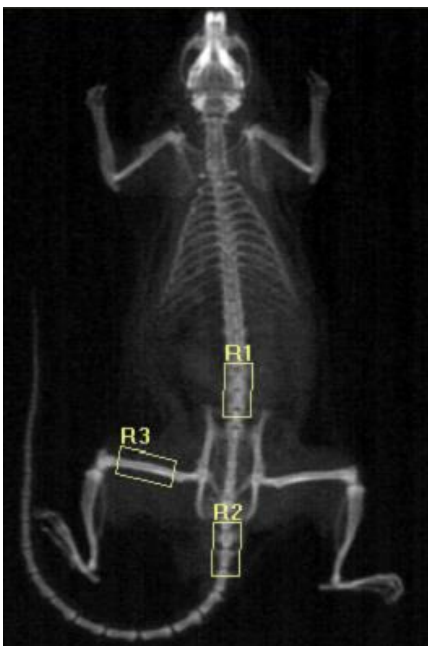
(Rat/Mouse PINP, $\mu\text{g/l}$) a karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I (CTX-I, RatLapsTM, $\mu\text{g/l}$).

3.3.4 Denzitometrické vyšetření

Po usmrcení a vyjmutí vnitřních orgánů byla zvířata převezena na Osteologické centrum FN HK, kde byla změřena celotělová kostní minerální hustota metodou DXA na přístroji Hologic Delphi A (QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA) (Obrázek 6). Kostní minerální hustota (BMD, g/cm^2) byla vyhodnocena ve třech částech těla potkana: oblast femuru, bederních a ocasních obratlů (Obrázek 7) a byl také změřen procentuální obsah tukové tkáně celého těla potkana (lean+BMC). Všechna měření byla vyhodnocena s použitím softwaru s vysokou rozlišovací schopností určeného pro měření malých zvířat (DXA, Hologic, MA, USA).



Obrázek 6: Poloha potkan v průběhu měření kostní minerální hustoty (BMD).



Obrázek 7: Sken potkana se zvýrazněnými oblastmi hodnocení kostní minerální hustoty (BMD).

3.3.5 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

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

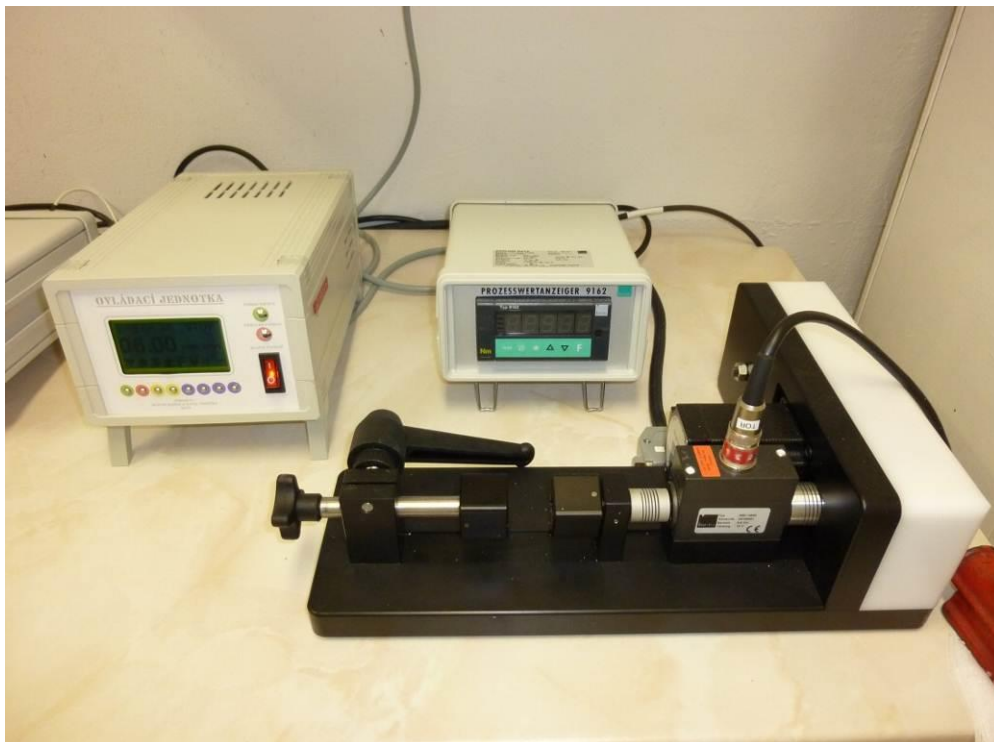
Pro validaci metody třibodového ohýbání byl přístroj otestován lámáním skleněných tyček (kapiláry pro odběr krve z oka). Lámání dřevěných špejlí se neosvědčilo pro jejich nestandardní pružnost. Sklo se z anorganických materiálů nejvíce blížilo kostem. Před zlomením byly tyčky zváženy a změřeny. Poté byly skleněné tyčky lámány přístrojem a postupně byl jejich počet zvyšován až na 15 kusů najednou. Každé zlomení bylo celkem opakováno 10krát.

- **Testování mechanické odolnosti kostní tkáně**

Mechanická odolnost kostní tkáně byla hodnocena pomocí tzv. „custom-made material testing machine“, tedy na zakázku vyrobeném elektromechanickém přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, ČR) (Obrázek 8; Obrázek 9).



Obrázek 8: “Na zakázku“ vyrobený přístroj pro testování mechanických vlastností kostí třibodovým ohýbáním a odolnosti v tlaku.



Obrázek 9: „Na zakázku“ vyrobený přístroj pro testování odolnosti kostí v torzi.

V našich experimentech byla testována odolnost diafýzy femuru v ohybu při tzv. tříbodovém ohýbání, odolnost krčku femuru v tlaku a odolnost tibie v torzi.

Zvířatům byly *post mortem* vyjmuty oba dva femury, tibie a část ocasních obratlů. Vyjmuté kosti byly očištěny od měkké tkáně, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

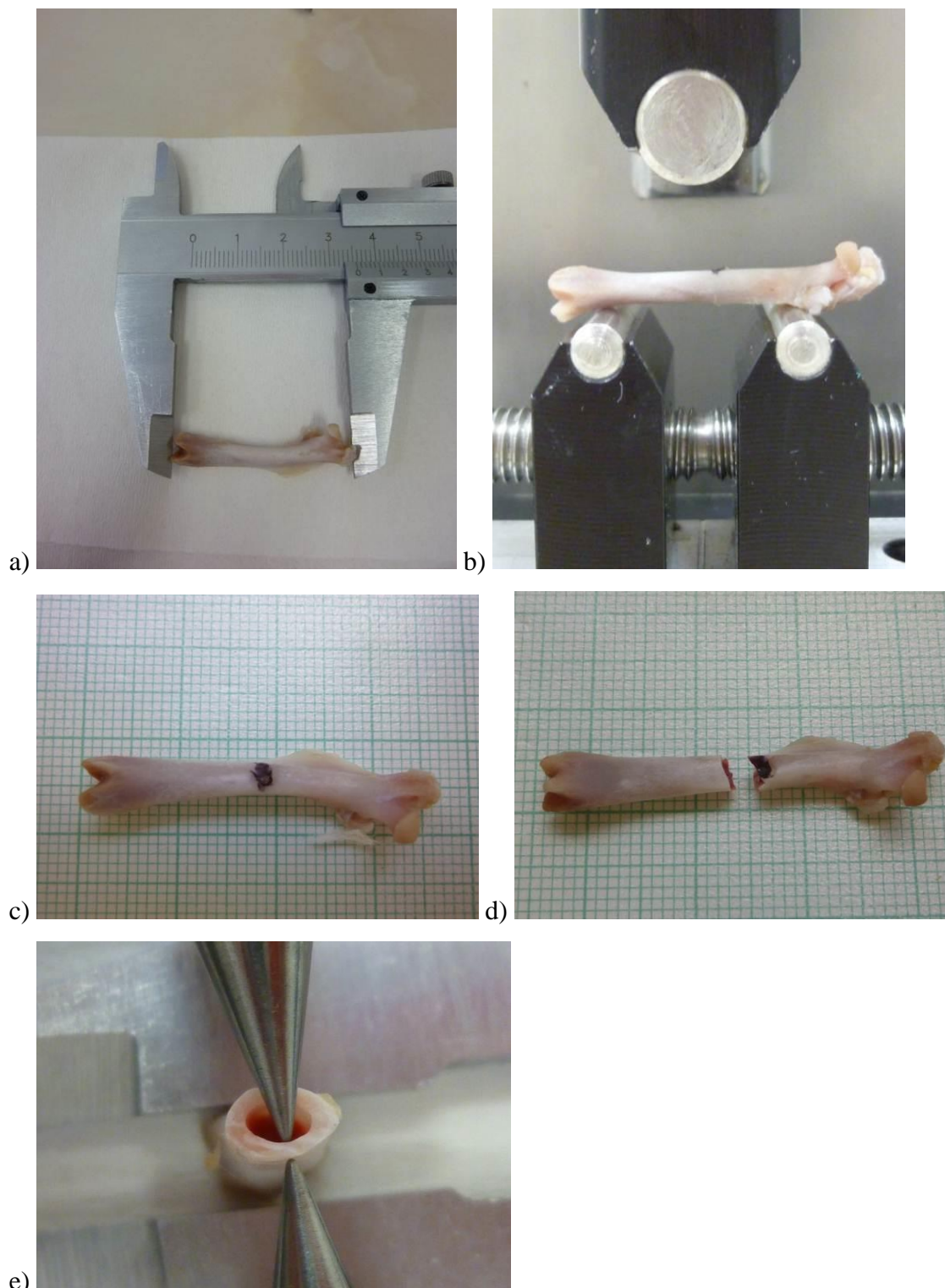
Zamražené vzorky kostí byly v den analýzy vyjmuty z mrazicího boxu a pozvolně rozmrazovány na pokojovou teplotu. Vzorky byly během testování chráněny před vysycháním zabalením do gázy napuštěné fyziologickým roztokem.

Před vlastním testováním odolnosti femuru v ohybu, tříbodovém ohýbání, byla změřena délka posuvným měřítkem (Metr-ISO-GewLux, Wermelskirchen, Německo) a voděodolným fixem byl vyznačen střed diafýzy femuru. V místě vyznačeného středu byl také pomocí posuvného mikrometru změřen průměr femuru (Oxford 0-25MM 30DEG Pointed Micrometer, Victoria Works, Leicester, Velká Británie). Kost byla následně zlomena při tříbodového ohýbání (Obrázek 10).

Kost byla položena na dva podpůrné body, které byly vzdálené od sebe 18 mm. Třetí bod, nerezový váleček o průměru 7 mm, směřoval svým zaoblením kolmo dolů na fixem vyznačený střed femuru. Femur byl testován v anteroposteriorním směru. Před vlastním zlomením byl femur zatížen malým stabilizačním napětím do 10 N k přesné

fixaci polohy femuru během lámání. Poté byl pomocí elektromotoru spuštěn konstantní rychlostí 6 mm/min nerezový váleček (Turner a Burr, 1993). Síla potřebná ke zlomení femuru byla zaznamenána pomocí snímací jednotky, která změřila maximální sílu vyvinutou na kost válečkem, než došlo ke zlomení kosti, a zobrazena pomocí zobrazovací jednotky (Snímač tahové a tlakové síly BURSTER 8435-6005; Procesní zobrazovací jednotka 9180-V3000, Burster praezisionsmesstechnik GmbH, Gernsbach, Německo). Po zlomení byla pomocí mikrometru změřena tloušťka kortikální kostní tkáně na distální části femuru v místě zlomu ve směru lámání.

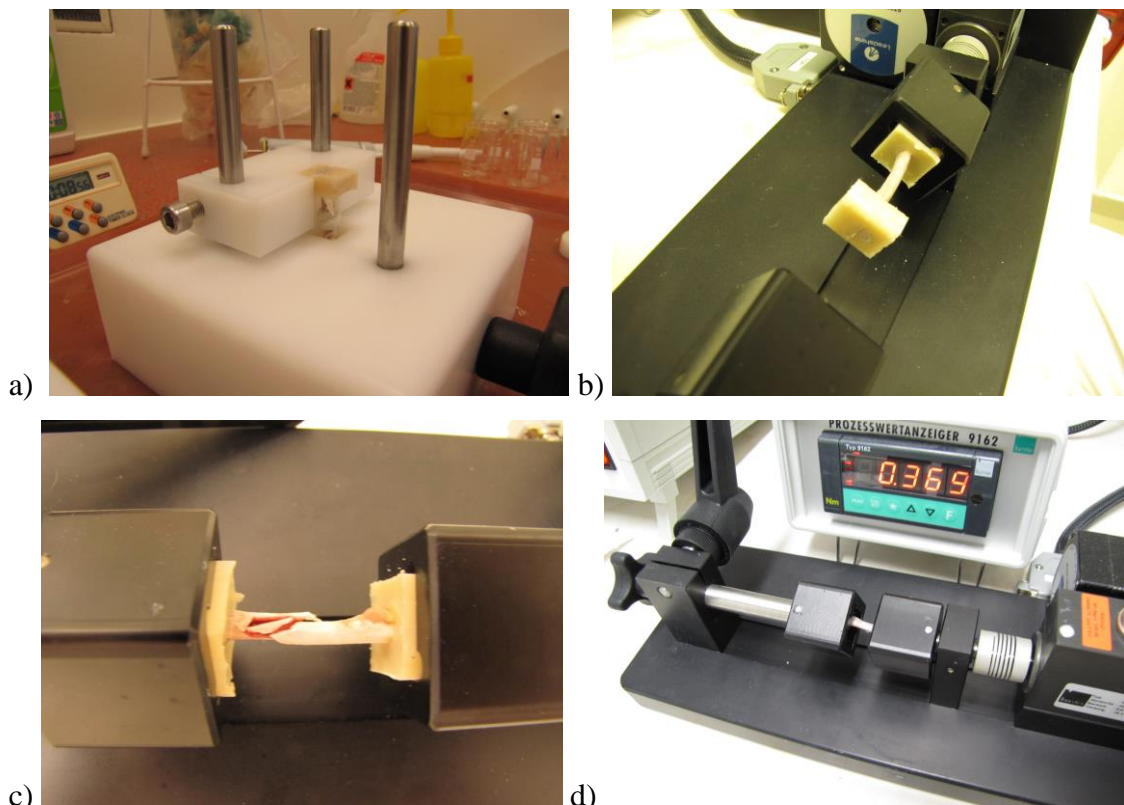
Odolnost v ohybu při tříbodovém ohýbání byla testována také u tibií. Stejně jako u femuru, byla i u tibie změřena délka a vyznačen střed kosti. Kost byla položena na dva podpůrné doby vzdálené od sebe 18 mm ve směru mediolaterálním, zatížena malým stabilizačním napětím do 10 N a poté testována rychlostí 6 mm/min. Síla nutná ke zlomení byla zaznamenána. Stejně jako u femuru byla měřena tloušťka kortikální kosti u anteriorní části středu tibie.



Obrázek 10: Testování mechanické odolnosti femuru při tříbodovém ohýbání

- a) Měření délky femuru.
- b) Poloha femuru při testování odolnosti při tříbodovém ohýbání.
- c) Označení středu femuru.
- d) Detail femuru po zlomení.
- e) Měření tloušťky kompaktní kosti femuru po tříbodovém ohýbání.

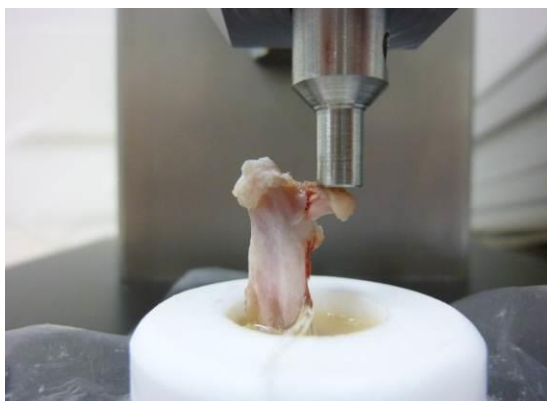
K testování odolnosti v torzi byla použita pravá tibia. Tibii bylo potřeba připravit k uchycení do speciálního fixačního zařízení, které umožňuje samotné testování. Oba konce tibie byly zafixovány pomocí samopolymerující adhezivní pryskyřice na bázi metylmetakrylátu (Spofacryl-SpofaDental a.s.; Jičín, ČR) pomocí speciální fixační nádoby. Střed kosti byl chráněn po dobu přípravy před vysycháním pomocí gázy navlhčené fyziologickým roztokem. Tibie byla ponořena do samopolymerující pryskyřice tak hluboko, aby délka kosti mezi zatavenými konci byla u všech testovaných tibií konstantní, tj. 22 mm. Takto zafixovaná kost byla umístěna do speciálního, na zakázku vyrobeného, fixačního zařízení. Po spuštění přístroje se jedna jeho část pomalu otáčí konstantní rychlostí 5°/minutu až dojde ke zlomení tibie (Obrázek 11). Druhá část fixačního zařízení se nepohybuje, zůstává ve stejné poloze po celou dobu testování. Distální část tibie se otáčí mediálně. Maximální síla nutná ke zlomení kosti v torzi (Nm) byla změřena pomocí snímací jednotky a zaznamenána zobrazovací jednotkou (Snímač krouticího momentu BURSTER typ 8651-4500 (0,5 Nm); Procesní zobrazovací jednotka typ 9162-V2000, Burster praezisiosmesstechnik GmbH, Gernsbach, Německo).



Obrázek 11: Testování odolnosti v torzi

- Zalítí konců tibie do pryskyřice před testováním.
- Uchycení tibie v přístroji.
- Zlomení tibie torzí.
- Záznam síly nutné ke zlomení tibie.

K testování tlakové odolnosti krčku femuru byla využita proximální část femuru, kterou jsme získali během tříbodového ohýbání (Obrázek 12). Zlomený konec femuru jsme ponořili do samopolymerující adhezivní pryskyřice vlité do speciální nádoby a tím se kost zafixovala v kolmé poloze s pomocí na zakázku vytvořeného držáku, který zajistil kolmou polohu kosti. Zároveň bylo nutné udržovat hlavici a krček femuru zabalené ve zvlhčené gáze, aby bylo zabráněno vysychání. K tlaku na hlavici femuru byla použita na zakázku vyrobená nerezová tyčka se zakulaceným koncem (průměr 4 mm), jejíž rychlost pohybu dolů byla 6 mm/min. Hlavice femuru byla opět zatížena malým stabilizačním napětím do 10 N k zajištění stabilní polohy kosti. Maximální síla (N) vynaložená ke zlomení krčku femuru byla změřena snímačem a zaznamenána zobrazovací jednotkou (Snímač tahové a tlakové síly BURSTER 8435-6005; Procesní zobrazovací jednotka 9180-V3000, Burster praezisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo).



Obrázek 12: Testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku.

3.3.6 Statistická analýza a zpracování dat

Statistická analýza byla provedena na Oddělení výpočetní techniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LFUK v HK) pomocí softwaru NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). V případě porovnání sledovaných parametrů mezi všemi skupinami v experimentu s aminokyselinami a bílkovinou byla testována hypotéza shody vůči alternativě, že alespoň dvě skupiny se od sebe liší. Pro porovnání parametrů mezi skupinami byla jako první krok použita analýza rozptylu. Při statistické významnosti analýzy rozptylu bylo provedeno mnohonásobné porovnání a byl použit Bonferroni test s kontrolou nebo Dunnettův test s kontrolou.

Při porovnání dvou skupin (realimentace a párové krmení), kdy se nejedná o skutečné páry, byl použit nepárový přístup, tedy dvouvýběrový t-test s případnou Bonferroniho modifikací.

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. Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (SD, standard deviation) nebo jako medián a percentily (25.-75. percentil). Hladina významnosti byla zvolena $\alpha=0,05$. Ke grafickému znázornění byly použity krabičkové grafy (tzv. Box Plot).

Výsledky experimentu s argininem a kreatininem byly statisticky zpracovány programem SigmaStat 3.1 JandelScientific® (San Rafael, CA, USA) pomocí nepárového t-testu a Mann-Whitney testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka (SD), v případě neparametrických hodnot jako medián a percentily (25.-75.). Hodnoty $p<0,05$ a nižší byly považovány za signifikantní. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha=0,05$.

4. Výsledky

4.1 Validace přesnosti přístroje

Během validace elektromechanického přístroje bylo zjištěno, že všechny skleněné tyčky byly stejně dlouhé (75 mm) a jejich hmotnost v miligramech byla $171,2 \pm 4,4$. Skleněné tyčky byly lámány přístrojem v počtu od 1 tyčky až do celkového počtu 15 tyček najednou. Každé zlomení bylo opakováno 10krát.

Statistickým vyhodnocením z naměřených hodnot síly nutné ke zlomení tyček je vidět nárůst síly nutné ke zlomení tyček (Tabulka 1). Určitá nepřesnost bude nejspíš zaviněna nehomogeností materiálu a malým počtem měření.

Tabulka 1: Validace přesnosti přístroje - Lámání skleněných tyček

Počet tyček	Síla (N) (průměr±SD)
1	7,909±0,780
2	15,273±1,550
3	13,273±2,195
4	23,727±2,420
6	36,273±4,266
7	40,091±4,222
8	46,364±4,374
9	62,545±5,839
10	65,818±6,003
11	70,091±6,497
12	80,818±7,168
15	101,545±9,419

4.2 Vliv diety obohacené o glutamin

Potkani krměni dietou obohacenou o glutamin v dávce 16,6 g doplněno do 100 g SLD (GLN) se nelišili v nárůstu tělesné hmotnosti na konci pokusu, ani v průměrné spotřebě diety ve srovnání se skupinou krměnou standardní laboratorní dietou (SLD) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Vliv glutaminu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
SLD	538,83±68,27	29,20±2,73
GLN	489,50±57,17	26,69±1,56

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

Mechanická odolnost kostní tkáně:

U skupiny krmené dietou obohacenou o glutamin (GLN) nebyl zjištěn rozdíl v délce, průměru, tloušťce kortikální kosti pravého femuru, ani v délce levého femuru a v tlakové odolnosti krčku obou femurů ve srovnání s kontrolní skupinou (Tabulka 3, Tabulka 4). Větší síla nutná ke zlomení pravého i levého femuru při tříbodovém ohýbání byla naměřena u skupiny GLN vs. SLD, ovšem bez statistické významnosti.

Tabulka 3: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Tříbodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,85±2,11	3,50±0,25	225,50±10,71	0,76±0,08	156,50±52,64
GLN	37,65±1,04	3,59±0,18	241,83±37,95	0,75±0,08	155,50±33,08

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Tabulka 4: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Tříbodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,50±1,64	232,83±23,09	137,00±26,24
GLN	37,67±0,57	247,67±25,13	142,83±30,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

LF, levý femur.

Nebyl zjištěn rozdíl mezi pravým a levým femurem téhož zvířete v žádném z výše zmiňovaných parametrů (Tabulka 5).

Tabulka 5: Vliv glutaminu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně (pravý versus levý femur).

	SLD			GLN		
	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
PF	38,85 ±2,11	225,50 ±10,71	156,50 ±52,64	37,65 ±1,04	241,83 ±37,95	155,50 ±33,08
LF	38,50 ±1,64	232,83 ±23,09	137,00 ±26,24	37,67 ±0,57	247,67 ±25,13	142,83 ±30,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

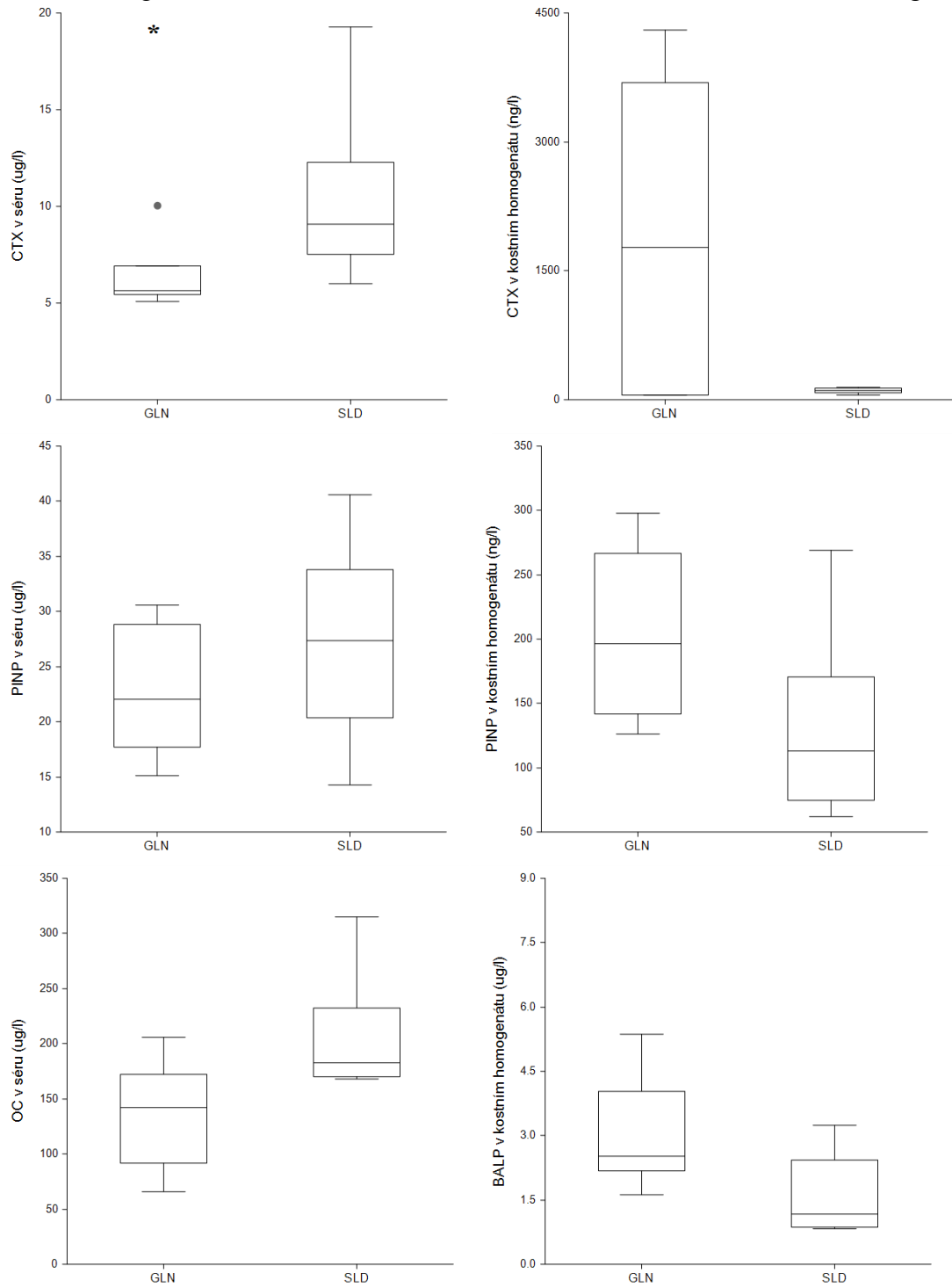
LF, levý femur; PF, pravý femur.

Biochemická analýza:

Statisticky významné zvýšení koncentrace CTX-I v kostním homogenátu bylo naměřeno u skupiny GLN vs. SLD ($p < 0,05$) (Graf 1). Naopak v séru byl sledován nevýznamný pokles v hladině CTX-I u skupiny GLN vs. SLD.

Také ostatní kostní markery měly stejný trend ve změnách hladin u skupiny GLN jako CTX-I, tj. zvýšení koncentrace PINP a BALP v kostním homogenátu a naopak snížení koncentrace PINP a OC v séru ve srovnání se skupinou SLD, ovšem bez statistické významnosti (Graf 1).

Graf 1: Vliv glutaminu na koncentraci kostních markerů v séru a v kostním homogenátu



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl oproti SLD (* $p < 0,05$).

Denzitometrické vyšetření:

U skupiny GLN nebyly nalezeny rozdíly v hodnotách kostní minerální hustoty ve srovnání se skupinou SLD (Tabulka 6). Tělesná hmotnost a procentuální obsah tělesného tuku u skupiny GLN vs. SLD byl nesignifikantně nižší (Graf 2).

Tabulka 6: Vliv glutaminu na kostní minerální hustotu.

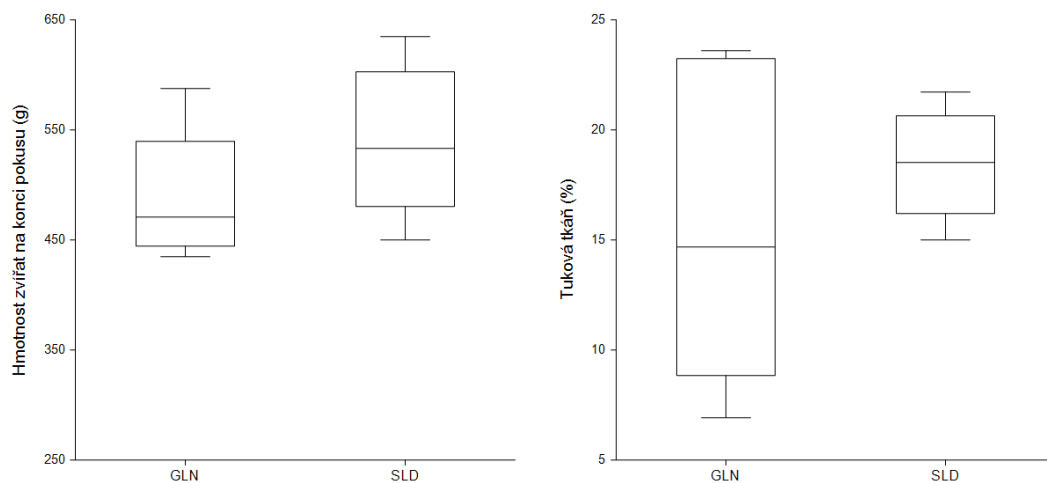
	BMD femuru (g/cm^2)	BMD bederních obratlů (g/cm^2)	BMD ocasních obratlů (g/cm^2)
SLD	0,22±0,03	0,23±0,01	0,24±0,02
GLN	0,24±0,02	0,23±0,02	0,23±0,02

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

Graf 2: Vliv glutaminu na tělesnou hmotnost zvířat a na procentuální obsah tukové tkáně.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; GLN, zvířata krmená SLD obohacenou o glutamin *ad libitum*.

4.3 Vliv diety obohacené o arginin

Potkani živení 12 týdnů dietou obohacenou o 10 % argininu *ad libitum* (Arg-S) se v nárůstu tělesné hmotnosti na konci experimentu nelišili od kontrol živených standardní laboratorní dietou *ad libitum* (ST1-S). Stejně i spotřeba diety na potkana a den byla v průběhu pokusu u obou skupin téměř stejná (Tabulka 7).

Tabulka 7: Vliv argininu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
ST1-S	515,50±12,83	28,85±0,81
Arg-S	490,60±18,03	28,85±1,04

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*

Mechanická odolnost kostí:

U skupiny Arg-S nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v parametrech a v mechanických vlastnostech ani levého ani pravého femuru (Tabulka 8, Tabulka 9). Pouze průměr obou femurů byla nevýznamně nižší u skupiny Arg-S ve srovnání s ST1-S.

Tabulka 8: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	37,83±0,56	3,59±0,12	139,1±16,12	151,50±7,84	0,68±0,15
Arg-S	37,91±0,60	3,51±0,31	139,4±12,64	150,8±18,11	0,67±0,28

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 9: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	37,91±0,63	3,58±0,15	138,8±12,9	147,81±22,70	0,70±0,03
Arg-S	38,20±0,60	3,53±0,18	139,4± 9,4	149,50±17,07	0,69±0,03

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Mechanické testování prokázalo, že levá tibie potkanů skupiny Arg-S byla méně odolná vůči ohybu ($p < 0,01$) ve srovnání s ST1-S. Ostatní parametry kosti, průměr a tloušťka kortikální kosti, byly také nižší vs. ST1-S, ale nevýznamně (Tabulka 10).

Pravé tibie skupiny Arg-S byly statisticky významně slabší ve svém průměru ($p < 0,05$) a nesignifikantně v tloušťce kompakty vs. ST1-S. Zjistili jsme nevýznamně nižší hodnoty síly nezbytné ke zlomení levé tibie torzí (Tabulka 11).

Tabulka 10: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.

LT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	40,73±1,51	2,75±0,37	130,50±18,43	0,521±0,009
Arg-S	40,74±0,91	2,58±0,09	109,40±11,54 *	0,515±0,012

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krměná SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

LT, levá tibie.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* $p < 0,01$).

Tabulka 11: Vliv argininu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie

PT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Torze (Nm)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	39,71±0,37	2,90±0,28	297,44±13,28	0,541±0,094
Arg-S	40,91±0,82	2,73±0,09 *	272,10±46,98	0,534±0,012

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krměná SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

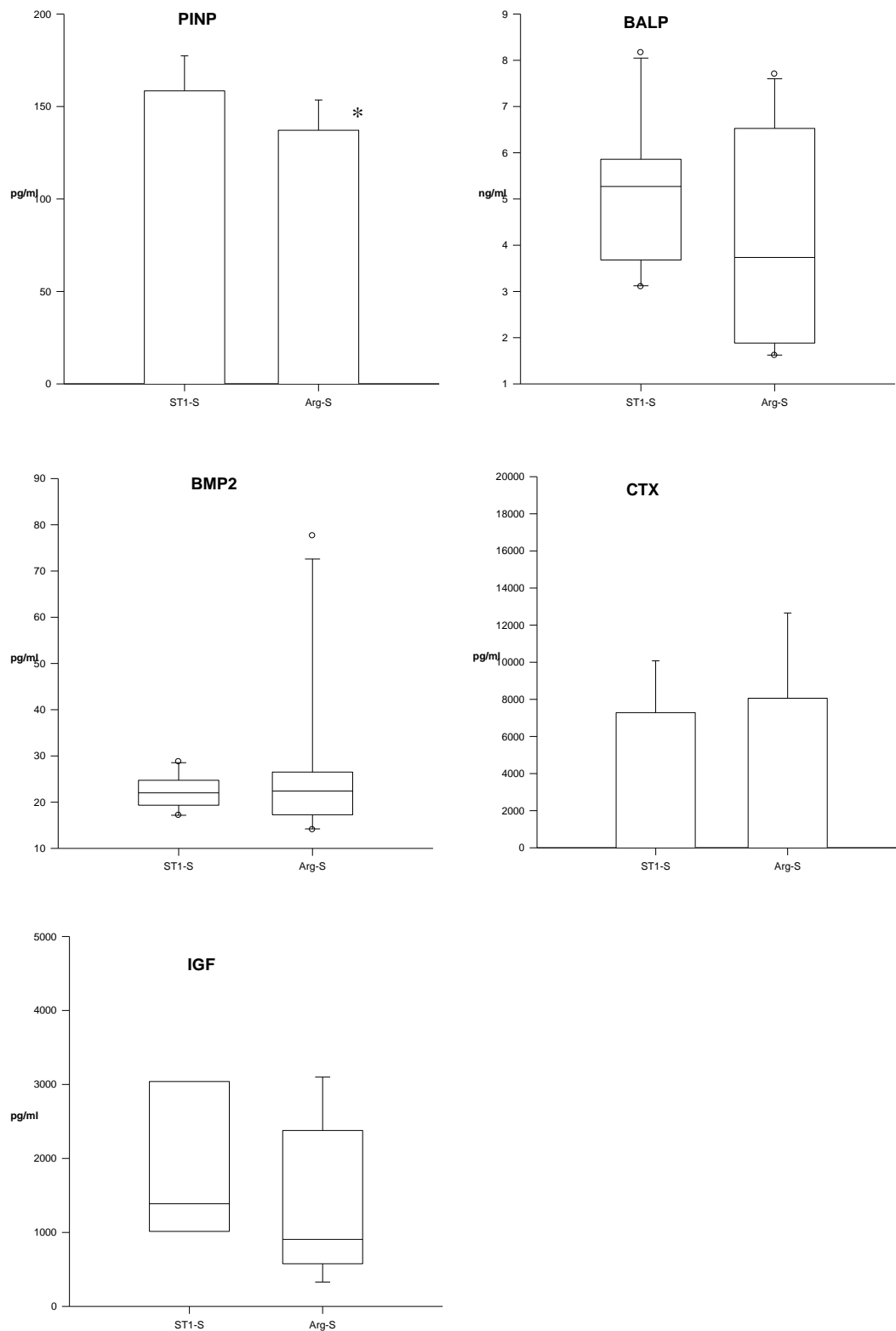
PT, pravá tibie.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* $p < 0,05$).

Biochemická analýza:

U skupiny krměné dietou obohacenou o arginin došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace PINP v kostním homogenátu (Graf 3). Dále byl zjištěn pokles koncentrace BALP a IGF-I a nárůst CTX-I u skupiny Arg-S ve srovnání s ST1-S, ale tyto rozdíly nebyly statisticky významné.

Graf 3: Vliv argininu na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, nebo jako medián (25.-75. percentil), $n=10$.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* $p < 0,05$).

PINP ng/l; BALP μ g/l; BMP-2 ng/l; CTX-I ng/l; IGF-I ng/l.

Denzitometrické vyšetření:

Vyhodnocením naměřených hodnot kostní minerální hustoty u obou skupin jsme zjistili nižší hodnoty BMD ve všech sledovaných oddílech těla u skupiny potkanů Arg-S ve srovnání se skupinou ST1-S, tyto změny ale nebyly statisticky významné (Tabulka 12).

Tabulka 12: Vliv argininu na kostní minerální hustotu.

	BMD celotělová (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD LF (g/cm²)	BMD PF (g/cm²)
ST1-S	0,170±0,028	0,225±0,091	0,203±0,132	0,201±0,161
Arg-S	0,167±0,056	0,216±0,123	0,183±0,101	0,180±0,113

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Z vyhodnocení složení těla u potkanů vyplývá, že potkani živeni dietou obohacenou o arginin měli statisticky významně nižší procentuální množství tukové tkáně ve srovnání s kontrolní skupinou (Tabulka 13).

Tabulka 13: Vliv argininu na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na obsah tuku v organismu.

	Svalová tkáň (lean+BMC) (g)	Tuk (g)	Tuk (%)
ST1-S	342±28	75±18	17,8±4,1
Arg-S	348±31	57±22	13,8±3,7 *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* p<0,05).

4.4 Vliv diety obohacené o kreatin

Potkani krmení po dobu 12 týdnů dietou obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum* (Krea-S) měli nižší nárůst tělesné hmotnosti na konci pokusu, ale mírně vyšší spotřebu diety ve srovnání s ST1-S. Výsledky ale nejsou signifikantní (Tabulka 14).

Tabulka 14: Vliv kreatinu na tělesnou hmotnost zvířat v průběhu pokusu a průměrná spotřeba diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
ST1-S	515,50±12,83	28,85±0,81
Krea-S	456,00±11,02	31,80±0,55

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krměná SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

Mechanická odolnost kostí:

U skupiny Krea-S nebyly zaznamenány rozdíly v délce, v průměru, v mechanické odolnosti a v tloušťce kortikální kosti levého ani pravého femuru vůči skupině ST1-S (Tabulka 15, Tabulka 16).

Tabulka 15: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	37,83±0,56	3,59±0,12	139,10±16,10	151,50± 7,80	0,68±0,15
Krea-S	38,32±0,94	3,54±0,15	139,50±13,20	148,40±13,50	0,68±0,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krměná SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 16: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	37,91±0,63	3,58±0,15	138,80±12,90	147,80±22,70	0,70±0,03
Krea-S	38,10±0,62	3,52±0,12	139,40± 7,50	149,40±18,90	0,69±0,09

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krměná SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

PF, pravý femur.

U skupiny suplementované Krea-S byla naměřena menší tloušťka u pravé tibie ($p<0,05$) ve srovnání s kontrolou (Tabulka 18). Obě tibie potkanů živených dietou obohacenou o kreatin byly delší, měly menší průměr a menší tloušťku kostní kompakty

v místě zlomení. Menší byla jak odolnost vůči ohybu u levé tibie tak vůči torzi ve srovnání s ST1-S (Tabulka 17, Tabulka 18). Výsledky ale nejsou signifikantní.

Tabulka 17: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.

LT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka (mm)
ST1-S	40,73±1,51	2,75±0,37	130,50±18,43	0,521±0,009
Krea-S	41,15±0,60	2,69±0,09	126,20±11,35	0,516±0,006

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

LT, levá tibie.

Tabulka 18: Vliv kreatinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.

PT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Torze (Nm)	Tloušťka (mm)
ST1-S	39,71±0,37	2,90±0,28	297,44±13,28	0,541±0,009
Krea-S	40,97±0,60	2,78±0,25	288,20±24,47	0,528±0,012*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

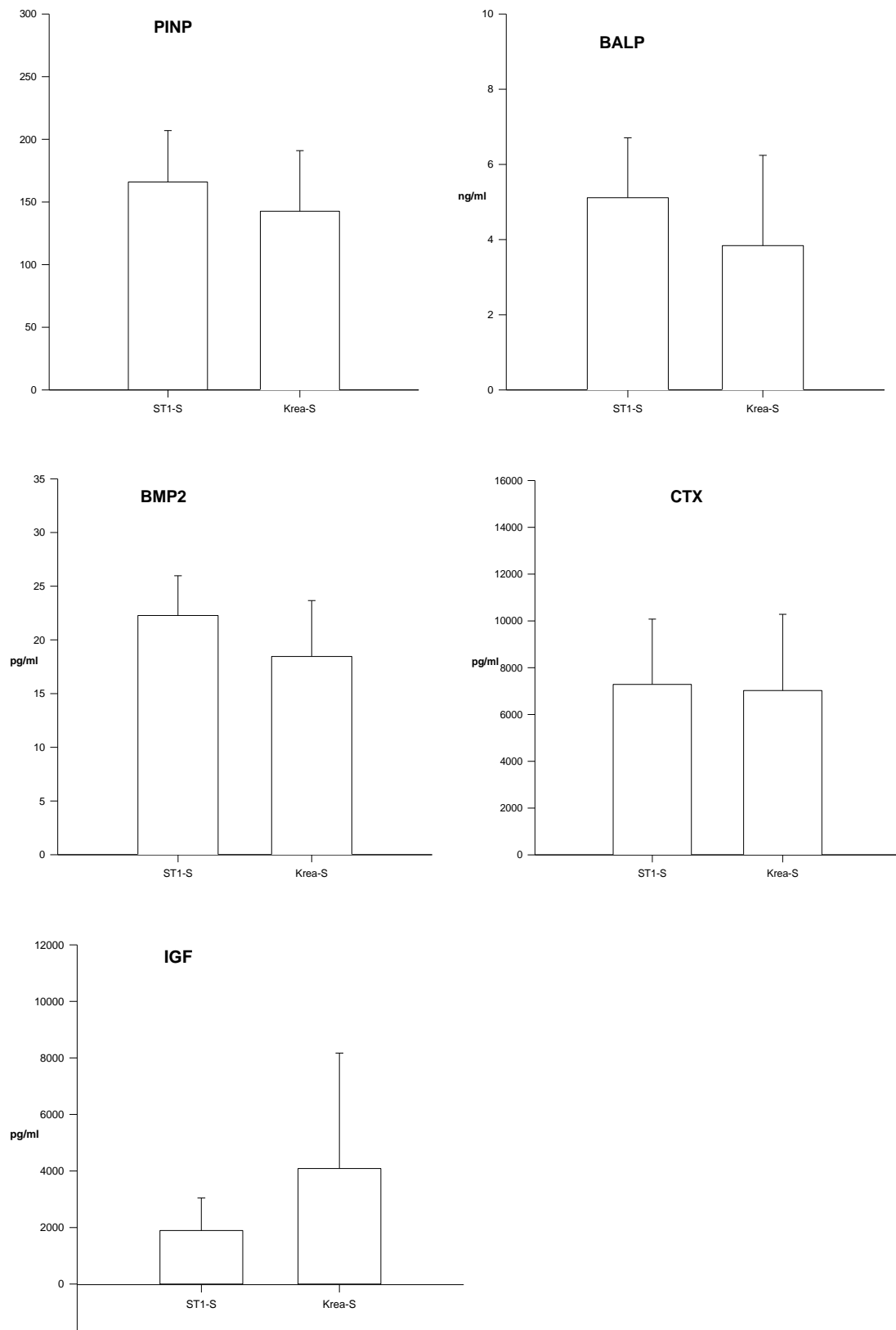
PT, pravá tibie.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* p<0,05).

Biochemická analýza:

Vyhodnocením homogenátu kostí u skupiny Krea-S jsme zjistili, že došlo k nevýznamnému poklesu všech sledovaných markerů kostního obratu, PINP, BALP, BMP-2 a CTX-I, s výjimkou IGF-I, který naopak nevýznamně vzrostl ve srovnání se skupinou ST1-S (Graf 4).

Graf 4: Vliv kreatinu na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

PINP ng/l; BALP μ g/l; BMP-2 ng/l; CTX-I ng/l; IGF-I ng/l.

Denzitometrické vyšetření:

U skupiny Krea-S došlo k mírnému navýšení BMD v oblasti celého těla, v bederních obratlích a naopak k poklesu v oblasti obou femurů (Tabulka 19). Všechny změny v kostní minerální hustotě byly statisticky nevýznamné.

Tabulka 19: Vliv kreatinu na kostní minerální hustotu.

	BMD celotělová (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD LF (g/cm²)	BMD PF (g/cm²)
ST1-S	0,170±0,028	0,225±0,091	0,203±0,132	0,201±0,161
Krea-S	0,178±0,060	0,233±0,107	0,187±0,072	0,189±0,113

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Vlivem diety s kreatinem došlo k statisticky významnému poklesu množství tukové tkáně ($p < 0,001$) i svalové hmoty (lean+BMC) ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou ST1-S (Tabulka 20).

Tabulka 20: Vliv kreatinu na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na procentuální obsah tuku.

	Svalová tkáň (lean+BMC) (g)	Tuk (g)	Tuk (%)
ST1-S	342±28	75±18	17,8±4,1
Krea-S	317±22*	39±9**	10,9±1,8**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl oproti ST1-S (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

4.5 Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny

Potkani krmení dietou obohacenou o větvené aminokyseliny valin:leucin:izoleucin v poměru 1:2:1 (28,7 g směsi doplněno SLD do 100 g; BCAA) měli statisticky významně nižší tělesnou hmotnost na konci pokusu vs. SLD ($p < 0,001$) a také průměrná spotřeba diety ve srovnání s SLD byla nižší ($p < 0,001$) (Tabulka 21).

Tabulka 21: Vliv BCAA na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
SLD	538,83±68,27	29,20±2,73
BCAA	358,83±73,09 **	20,72±3,29**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krmená SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl proti SLD (** p<0,001).

Mechanická odolnost kostní tkáně:

U potkanů BCAA byl zjištěn statisticky významně nižší nárůst kostí do délky u pravého (p<0,01) i levého femuru (p<0,001) ve srovnání se SLD v průběhu experimentu (Tabulka 22, Tabulka 23). U obou femurů u skupiny BCAA byl zjištěn menší průměr, tloušťka a naměřena menší síla nutná jak ke zlomení femuru, tak i krčku ve srovnání se SLD, významně pouze u tříbodového ohýbání levého femuru (p<0,05). Nebyl zjištěn rozdíl mezi pravým a levým femurem v žádném ze zmiňovaných parametrů a mechanických vlastností kostí u jednotlivých zvířat (data neuvedena).

Tabulka 22: Vliv BCAA na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Tříbodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,50±1,64	232,83±23,09	137,00±26,24
BCAA	35,00±1,10**	186,50±34,41*	122,17±28,39

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krmená SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

LF, levý femur.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* p<0,05; ** p<0,001).

Tabulka 23: Vliv BCAA na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Tříbodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,85±2,11	3,50±0,25	225,50±10,71	0,76±0,08	156,50±52,64
BCAA	35,32±1,63*	3,38±0,19	201,17±33,92	0,70±0,07	133,00±37,13

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krmená SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* p<0,01).

Biochemická analýza:

Statisticky významný pokles hladiny CTX-I v séru byl zjištěn u skupiny BCAA ($p < 0,05$) vs. SLD (Tabulka 24). Podobně hodnoty ostatních kostních markerů v séru, OC a PINP, poklesly, ale nevýznamně (Tabulka 24).

Hodnoty kostních markerů v kostním homogenátu se u skupiny s BCAA dietou ve srovnání se skupinou SLD nezměnily, s výjimkou PINP, jehož koncentrace nesignifikantně narostla (Tabulka 25).

Tabulka 24: Vliv BCAA na koncentrace kostních markerů v séru.

	OC ($\mu\text{g/l}$)	CTX-I ($\mu\text{g/l}$)	PINP ($\mu\text{g/l}$)
SLD	203,95 \pm 55,90	10,23 \pm 4,64	27,25 \pm 8,97
BCAA	120,32 \pm 75,51	5,79 \pm 1,45*	21,03 \pm 6,76

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

SLD, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krměná SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* $p < 0,05$).

Tabulka 25: Vliv BCAA na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP ($\mu\text{g/l}$)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
SLD	1,55 \pm 0,99	106,82 \pm 32,57	128,92 \pm 75,22
BCAA	1,51 \pm 1,50	94,34 \pm 44,51	209,86 \pm 82,1

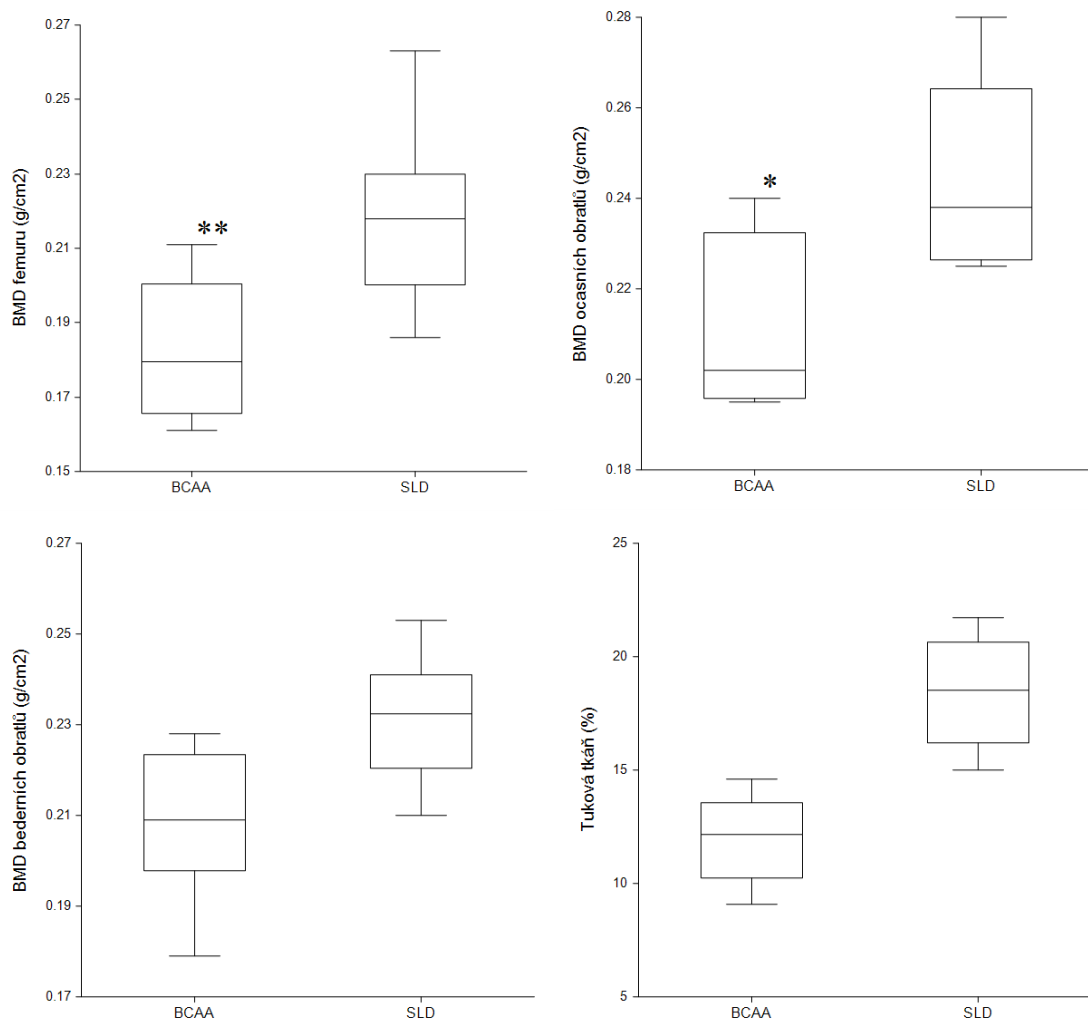
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

SLD, zvířata krměná standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krměná SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

Denzitometrické vyšetření:

Signifikantní snížení hustoty kostního minerálu bylo naměřeno u potkanů s BCAA dietou v oblasti femuru ($p < 0,001$) a v ocasních obratlích ($p < 0,05$) vs. potkani s SLD dietou. Procentuální obsah tukové tkáně byl u skupiny BCAA nižší ve srovnání s SLD, ale nevýznamně (Graf 5).

Graf 5: Vliv BCAA na kostní minerální hustotu a procentuální obsah tukové tkáně.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; BCAA, zvířata krmená SLD obohacenou o BCAA *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

4.6 Vliv diety obohacené o kasein

Potkani krmení dietou obohacenou o kasein v množství 19,7 g doplněno do 100 g SLD neměli statisticky významné rozdíly v nárůstu tělesné hmotnosti na konci pokusu ani v průměrné spotřebě diety ve srovnání se SLD (Tabulka 26).

Tabulka 26: Vliv kaseinu na tělesnou hmotnost na konci pokusu a průměrná spotřeba diety

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
SLD	538,83±68,27	29,20±2,73
KAS	495,50±41,31	24,16±1,27

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

Mechanická odolnost kostní tkáně:

U potkanů s dietou KAS nedošlo k ovlivnění mechanických vlastností kostí vs. SLD (Tabulka 27, Tabulka 28). Nebyl nalezen rozdíl mezi pravým a levým femurem v žádném ze sledovaných parametrů, tj. délka, průměr a tloušťka kosti, dále třibodové ohýbání a odolnost krčku femuru v tlaku u jednotlivých zvířat.

Tabulka 27: Vliv kaseinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,50±1,64	232,83±23,09	137,00±26,24
KAS	38,17±1,33	231,83±22,89	151,33±33,45

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 28: Vliv kaseinu na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,85±2,11	3,50±0,25	225,5±10,71	0,76±0,08	156,50±52,64
KAS	37,87±1,35	3,46±0,28	235,33±27,66	0,71±0,06	148,50±17,63

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Biochemická analýza:

U potkanů živěných dietou KAS nedošlo ke změnám v koncentracích kostních markerů v séru ani v kostním homogenátu (Tabulka 29, Tabulka 30).

Tabulka 29: Vliv kaseinu na koncentrace kostních markerů v séru.

	OC (µg/l)	CTX-I (µg/l)	PINP (µg/l)
SLD	203,95±55,9	10,23±4,64	27,25±8,97
KAS	207,19±84,92	7,21±1,68	25,99±9,79

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

Tabulka 30: Vliv kaseinu na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
SLD	1,55±0,99	106,82±32,57	128,92±75,22
KAS	2,55±3,20	64,72±43,36	142,04±73,35

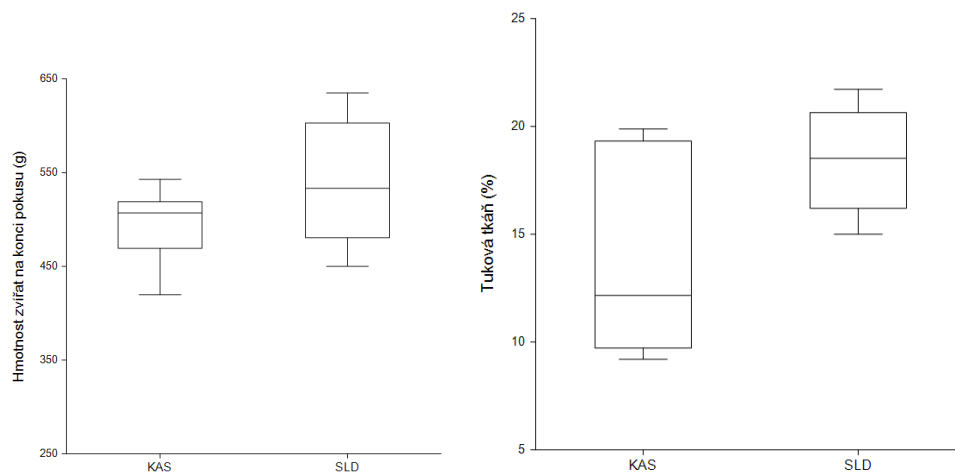
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

Denzitometrické vyšetření:

U potkanů skupiny KAS jsme zaznamenali statisticky nevýznamně menší nárůst tělesné hmotnosti a obsahu tělesného tuku ve srovnání s SLD (Graf 6). Hustota kostního minerálu nebyla vlivem diety s kaseinem vs. SLD ovlivněna (Tabulka 31).

Graf 6: Vliv kaseinu na hmotnost zvířat a procentuální obsah tělesného tuku na konci pokusu.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*.

Tabulka 31: Vliv kaseinu na kostní minerální hustotu.

	BMD femuru (g/cm ²)	BMD bederních obratlů (g/cm ²)	BMD ocasních obratlů (g/cm ²)
SLD	0,22±0,03	0,23±0,01	0,24±0,02
KAS	0,22±0,03	0,24±0,02	0,23±0,01

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená standardní laboratorní dietou *ad libitum*; KAS, zvířata krmená SLD obohacenou o kasein *ad libitum*. BMD, kostní minerální hustota.

4.7 Vliv realimentace SLD

4.7.1 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Převedením potkanů krmených dietou obohacenou o kasein v posledním týdnu experimentu na dietu SLD, tj. realimentace SLD *ad libitum* (KAS-R), nedošlo k žádnému statisticky významnému rozdílu v parametrech a v mechanických vlastnostech kostní tkáně u pravého, ani u levého femuru, ve srovnání s potkany živěnými dietou KAS až do usmrcení (Tabulka 32, Tabulka 33).

Tabulka 32: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
KAS	38,17±1,33	231,83±22,89	151,33±33,45
KAS-R	38,25±1,40	255,50±23,26	153,83±20,57

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 33: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
KAS	37,87±1,35	3,46±0,28	235,33±27,66	0,71±0,06	148,50±17,63
KAS-R	38,08±1,20	3,75±0,22	241,00±16,41	0,78±0,03	141,00±18,51

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

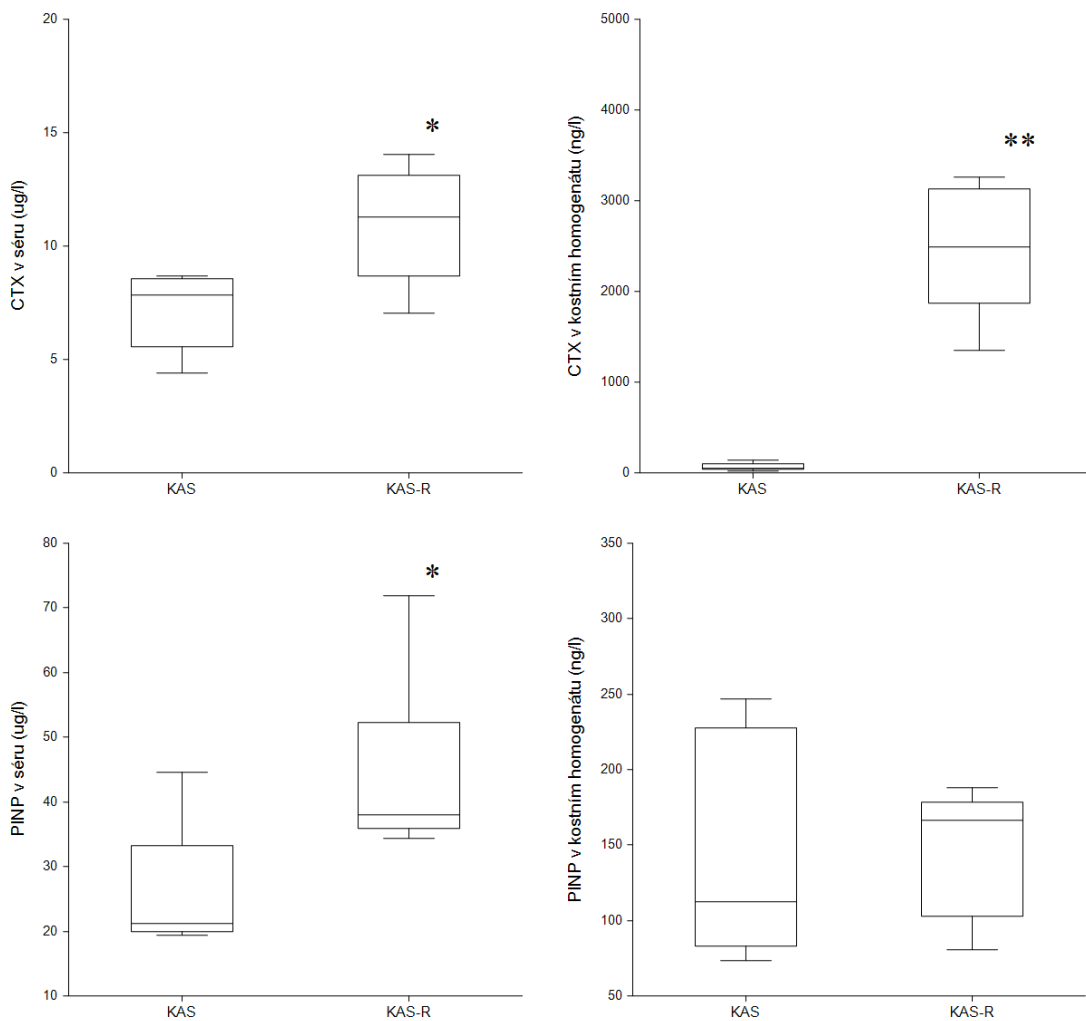
KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Biochemická analýza:

U potkanů živených dietou KAS-R došlo k statisticky významnému zvýšení koncentrace CTX-I jak v séru ($p < 0,05$), tak i v kostním homogenátu ($p < 0,001$) a také zvýšení koncentrace PINP v séru ($p < 0,05$) vlivem realimentace ve srovnání se skupinou bez realimentace (KAS) (Graf 7, Tabulka 34).

Graf 7: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na koncentraci CTX-I a PINP v séru a kostním homogenátu.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl proti KAS (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Tabulka 34: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na koncentrace kostních markerů v séru a v kostním homogenátu.

	OC v séru ($\mu\text{g/l}$)	BALP v kostním homogenátu ($\mu\text{g/l}$)
KAS	207,19 \pm 84,92	2,55 \pm 3,20
KAS-R	186,20 \pm 28,36	3,91 \pm 1,25

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Denzitometrické vyšetření:

Realimentace SLD po dobu jednoho týdne neovlivnila kostní minerální hustotu (Tabulka 35), tělesnou hmotnost ani procentuální obsah tělesného tuku u skupiny KAS-R ve srovnání se skupinou KAS (Graf 8).

Tabulka 35: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na kostní minerální hustotu.

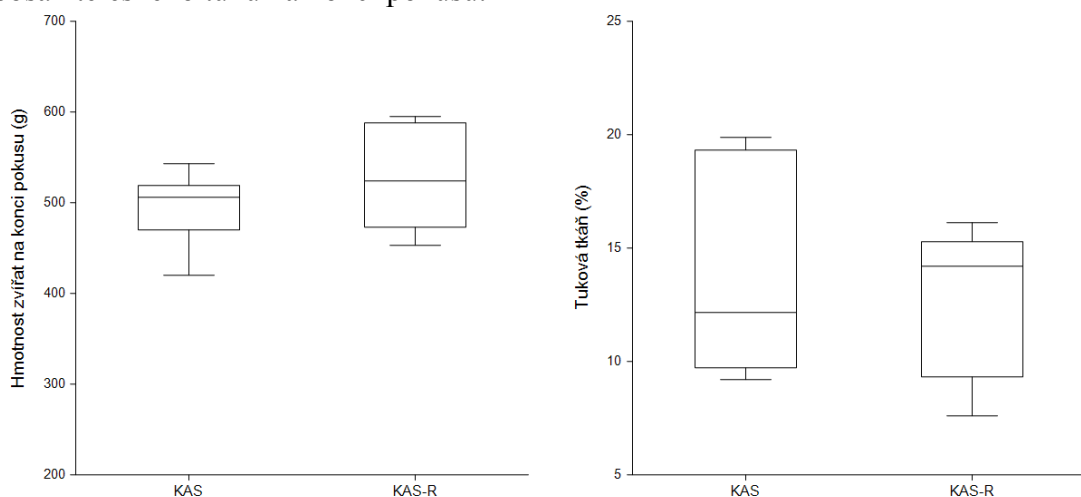
	BMD femuru (g/cm^2)	BMD bederních obratlů (g/cm^2)	BMD ocasních obratlů (g/cm^2)
KAS	0,22 \pm 0,03	0,24 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01
KAS-R	0,20 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

Graf 8: Vliv realimentace SLD po KAS dietě na tělesnou hmotnost a na procentuální obsah tělesného tuku na konci pokusu.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

4.7.2 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Po realimentaci dietou SLD v posledním týdnu experimentu potkanů krmených dietou s nadbytkem BCAA po dobu 14 týdnů (BCAA-R) nedošlo k žádnému statisticky významnému rozdílu v parametrech a mechanických vlastnostech ani u pravého, ani u levého femuru ve srovnání skupinou BCAA bez realimentace (Tabulka 36, Tabulka 37).

Tabulka 36: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,00±1,10	186,50±34,41	122,17±28,39
BCAA-R	36,28±1,79	188,00±40,5	137,00±31,74

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; BCAA-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 37: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,32±1,63	3,38±0,19	201,17±33,92	0,70±0,07	133,00±37,13
BCAA-R	36,45±1,26	3,25±0,33	189,00±34,57	0,70±0,10	118,67±24,23

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

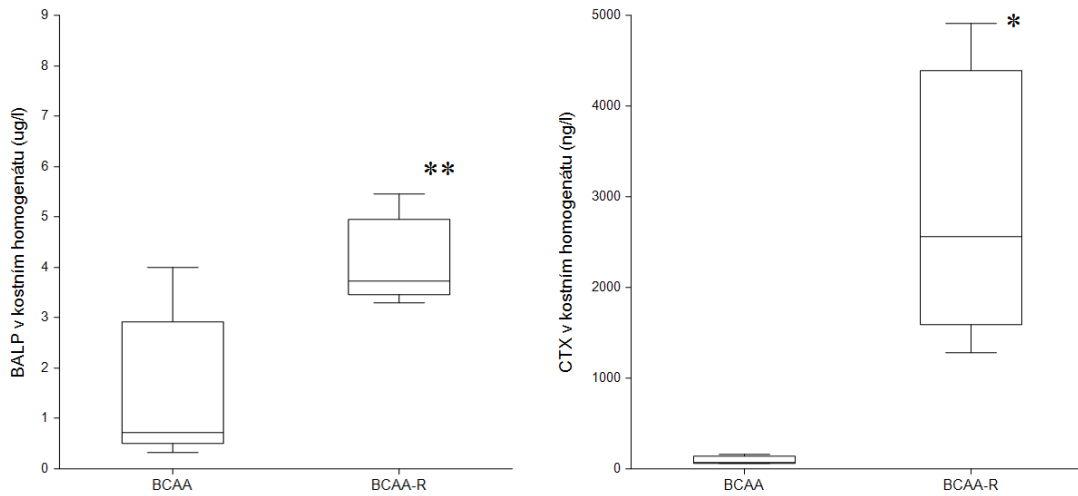
BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; BCAA-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

PF, pravý femur.

Biochemická analýza:

Vlivem týdenní realimentace dietou SLD došlo ke statisticky významnému nárůstu koncentrace CTX-I ($p < 0,05$) a BALP ($p < 0,001$) v kostním homogenátu vs. skupina bez realimentace (Graf 9, Tabulka 38).

Graf 9: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na koncentraci BALP a CTX-I v kostním homogenátu:



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; BCAA-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Tabulka 38: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na koncentraci kostních markerů v séru a v kostním homogenátu.

	OC v séru ($\mu\text{g/l}$)	CTX-I v séru ($\mu\text{g/l}$)	PINP v séru ($\mu\text{g/l}$)	PINP v kostním homogenátu (ng/l)
BCAA	120,32 \pm 75,51	5,79 \pm 1,45	21,03 \pm 6,76	209,86 \pm 82,10
BCAA-R	136,23 \pm 49,95	6,31 \pm 1,84	22,77 \pm 6,09	150,04 \pm 16,18

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; BCAA-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Denzitometrické vyšetření:

Vlivem týdenní realimentace dietou SLD došlo u BCAA-R k nevýznamnému nárůstu tělesné hmotnosti vs. BCAA (Tabulka 39). Množství tukové tkáně v organismu a kostní minerální hustota se ve vybraných oblastech skeletu nezměnila.

Tabulka 39: Vliv realimentace SLD po BCAA dietě na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.

	BMD femuru (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD ocasních obratlů (g/cm²)	Tuková tkáň (%)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
BCAA	0,18±0,02	0,21±0,02	0,21±0,02	11,97±1,95	358,83±73,09
BCAA-R	0,19±0,01	0,22±0,02	0,21±0,02	11,68±1,36	406,33±94,21

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; BCAA-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

4.7.3 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Vlivem 1 týdenní realimentace SLD po 14 týdnech na dietě obohacené o glutamin (GLN-R), nedošlo k žádnému statisticky významnému rozdílu v parametrech ani u pravého, ani u levého femuru mezi skupinou GLN bez realimentace a s realimentací (Tabulka 40, Tabulka 41). Nebyl zjištěn rozdíl v biomechanických vlastnostech mezi pravým a levým femurem skupiny GLN-R (data neuvedena).

Tabulka 40: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
GLN	37,67±0,57	247,67±25,13	142,83±30,06
GLN-R	36,08±3,26	249,50±41,73	148,33±54,74

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

GLN, zvířata krmená dietou obohacenou o GLN *ad libitum*; GLN-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

LF, levý femur.

Tabulka 41: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
GLN	37,65±1,04	3,59±0,18	241,83±37,95	0,75±0,08	155,50±33,08
GLN-R	38,10±1,66	3,72±0,23	241,80±35,58	0,86±0,04	142,75±38,51

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

GLN, zvířata krmená dietou obohacenou o GLN *ad libitum*; GLN-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

PF, levý femur.

Biochemická analýza:

Realimentace SLD po dobu 1 týdne nevedla u skupiny GLN-R ke změnám v hladinách kostních markerů ani v séru, ani v kostním homogenátu vůči skupině GLN. Koncentrace CTX-I v kostním homogenátu vykazovaly velké hodnoty směrodatných odchylek a je potřeba tyto výsledky opatrně interpretovat (Tabulka 42, Tabulka 43).

Tabulka 42: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na koncentrace kostních markerů v séru.

	OC (µg/l)	CTX-I (µg/l)	PINP (µg/l)
GLN	136,23±49,95	6,31±1,84	22,77±6,09
GLN-R	116,46±51,96	8,87±3,24	21,95±3,03

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

GLN, zvířata krmená dietou obohacenou o GLN *ad libitum*; GLN-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Tabulka 43: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
GLN	3,00±1,32	1909,06±2039,01	203,18±64,88
GLN-R	4,32±1,27	3841,44±953,88	194,77±50,10

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

GLN, zvířata krmená dietou obohacenou o GLN *ad libitum*; GLN-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

Denzitometrické vyšetření:

U potkanů GLN-R bylo zjištěno statisticky významné snížení BMD v oblasti femuru ($p < 0,05$) vs. skupina GLN. V ostatních hodnocených oblastech nebyl pozorován signifikantní rozdíl v BMD. Nárůst tělesné hmotnosti byl mírně vyšší, i když s velkou SD, množství tukové hmoty bylo naopak mírně nižší u skupiny GLN-R, ale bez statistické významnosti (Tabulka 44).

Tabulka 44: Vliv realimentace SLD po GLN dietě na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.

	BMD femuru (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD ocasních obratlů (g/cm²)	Tuková tkáň (%)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
GLN	0,24±0,02	0,23±0,02	0,23±0,02	15,42±6,97	489,50±57,17
GLN-R	0,21±0,03*	0,24±0,03	0,24±0,02	12,92±4,32	522,00±102,30

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

GLN, zvířata krměná dietou obohacenou o GLN *ad libitum*; GLN-R, zvířata realimentována SLD *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

Signifikantní rozdíl proti GLN (* p<0,05).

4.8 Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – párové krmení

4.8.1 Párové krmení standardní laboratorní dietou

SLD-P vs. SLD

Mechanická odolnost kostní tkáně:

U skupiny SLD-P, která byla krměna stejným množstvím standardní laboratorní diety jako byla spotřebována u skupiny BCAA, byla zjištěna statisticky významně snížená odolnost diafýzy femuru v tlaku při tříbodovém ohýbání u levého femuru (p<0,05) i pravého (p<0,01) ve srovnání se skupinou živenou SLD *ad libitum* (Tabulka 45, Tabulka 46). Další změny v biomechanických vlastnostech kostí nebyly vlivem párového krmení vs. SLD zaznamenány.

Tabulka 45: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Tříbodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
SLD	38,50±1,64	232,83±23,09	137,00±26,24
SLD-P	37,89±0,67	203,60±15,96*	139,33±16,57

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krměná SLD *ad libitum*; SLD-P, zvířata krměná SLD párově ke skupině BCAA.

LF, levý femur.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* p<0,05).

Tabulka 46: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

	Délka PF (mm)	Průměr PF (mm)	Třibodové ohýbání PF (N)	Tloušťka kortikální kosti PF (mm)	Tlaková odolnost krčku PF (N)
SLD	38,85±2,11	3,50±0,25	225,50±10,71	0,76±0,08	156,50±52,64
SLD-P	37,90±0,76	3,46±0,07	194,67±14,22**	0,69±0,04	118,00±19,58

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl proti SLD (** p<0,01).

Biochemická analýza:

Omezené množství přijímané potravy mělo vliv na kostní markery u skupiny SLD-P, kde došlo k nesignifikantnímu navýšení CTX-I a BALP a k poklesu koncentrace PINP v homogenátu kosti vs. SLD (Tabulka 47).

Tabulka 47: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
SLD	1,55±0,99	106,82±32,57	128,92±75,22
SLD-P	2,16±1,19	141,38±31,40	103,60±28,02

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

Denzitometrické vyšetření:

Kostní minerální hustota byla naměřena významně nižší pouze v oblasti femuru (p<0,01) u skupiny SLD-P ve srovnání se skupinou SLD. V ostatních hodnocených oblastech nedošlo k žádným změnám (Tabulka 48).

Párové krmení potkanů skupiny SLD-P vedlo k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti (p<0,05) v průběhu pokusu a s tím souvisejícímu nižšímu procentu celkového tělesného tuku (p<0,01) vs. SLD (Graf 10).

Tabulka 48: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na kostní minerální hustotu.

	BMD femuru (g/cm^2)	BMD bederních obratlů (g/cm^2)	BMD ocasních obratlů (g/cm^2)
SLD	0,22±0,03	0,23±0,01	0,24±0,02
SLD-P	0,17±0,01**	0,23±0,02	0,23±0,02

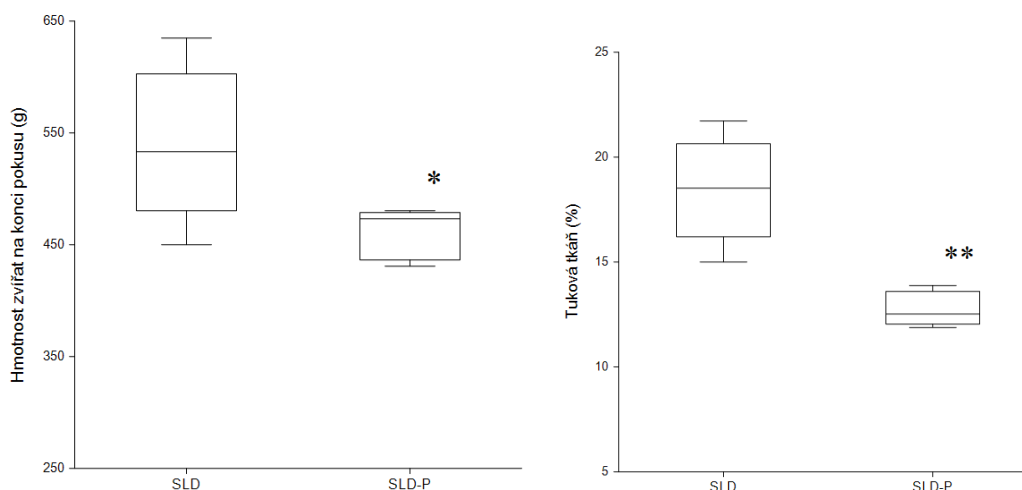
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

BMD, kostní minerální hustota.

Signifikantní rozdíl proti SLD (** p<0,01).

Graf 10: Vliv párového krmení u SLD diety vs. SLD skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat:



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* p<0,05, ** p<0,01).

BCAA vs. SLD-P

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Při porovnání skupin BCAA a SLD-P, které přijímaly stejné množství potravy, ale s jiným obsahem proteinů, měli potkani skupiny SLD-P statisticky významně delší levý ($p<0,001$) i pravý femur ($p<0,01$) (Tabulka 49, Tabulka 50). Ostatní parametry nebyly dietou s vyšším obsahem proteinů ovlivněny.

Tabulka 49: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,00±1,10	186,50±34,41	122,17±28,39
SLD-P	37,89±0,67**	203,60±15,96	139,33±16,57

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

LF, levý femur.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (** p<0,001).

Tabulka 50: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,32±1,63	3,38±0,19	201,17±33,92	0,70±0,07	133,00±37,13
SLD-P	37,90±0,76*	3,46±0,07	194,67±14,22	0,69±0,04	118,00±19,58

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* p<0,01).

Biochemická analýza:

Menší množství proteinů v potravě potkanů skupiny SLD-P vedlo v kostním homogenátu k významně nižším hodnotám PINP (p<0,05) a k vyšším hodnotám BALP a CTX-I oproti BCAA (Tabulka 51).

Tabulka 51: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
BCAA	1,51±1,50	94,34±44,51	209,86±82,10
SLD-P	2,16±1,19	141,38±31,40	103,60±28,02*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

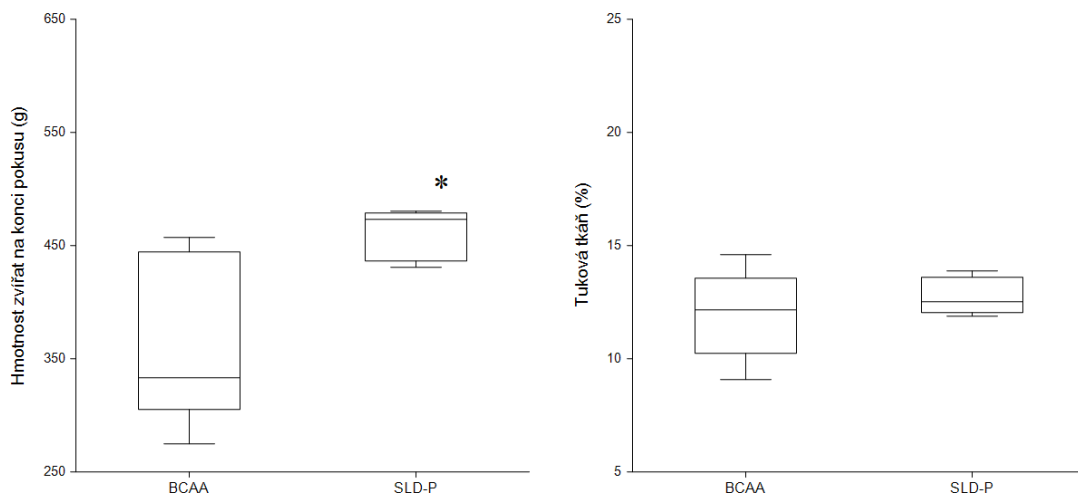
BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* p<0,05).

Denzitometrické vyšetření:

I přes příjem stejného množství potravy došlo u skupiny SLD-P ke statisticky významně vyššímu nárůstu tělesné hmotnosti ve srovnání se skupinou BCAA ($p < 0,05$) (Graf 11). Ke změnám v hustotě kostního minerálu vlivem rozdílných koncentrací aminokyselin v podávaných dietách (SLD vs. BCAA) při příjmu stejného množství potravy nedošlo (Tabulka 52).

Graf 11: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* $p < 0,05$).

Tabulka 52: Vliv párového krmení u SLD diety vs. BCAA skupina na kostní minerální hustotu.

	BMD femuru (g/cm^2)	BMD bederních obratlů (g/cm^2)	BMD ocasních obratlů (g/cm^2)
BCAA	0,18 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02
SLD-P	0,17 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; SLD-P, zvířata krmená SLD párově ke skupině BCAA.

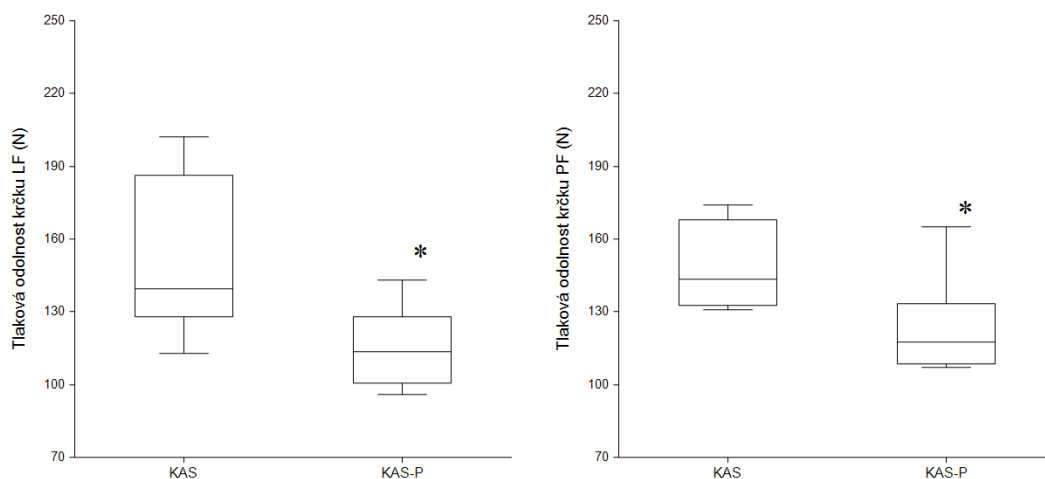
4.8.2 Párové krmení dietou obohacenou o kasein

KAS-P vs. KAS

Mechanická odolnost kostní tkáně:

U skupiny KAS-P, která byla krmena párově ke skupině BCAA, tedy dostávala stejné množství diety KAS, jako byla spotřebována u skupiny BCAA, bylo prokázáno statisticky významné snížení odolnosti krčku femuru v tlaku jak u pravého ($p < 0,05$), tak u levého femuru ($p < 0,05$) ve srovnání se skupinou živenou dietou KAS *ad libitum* (Graf 12). Snížení odolnosti femuru bylo též zjištěno při tříbodovém ohýbání u KAS-P vs. KAS, tento výsledek ovšem není statisticky významný (Tabulka 53, Tabulka 54).

Graf 12: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na odolnost krčku femuru v tlaku:



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl proti KAS (* $p < 0,05$).

Tabulka 53: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Tříbodové ohýbání (N)
KAS	38,17 \pm 1,33	231,83 \pm 22,89
KAS-P	37,92 \pm 0,82	228,50 \pm 15,53

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, $n=6$.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

LF, levý femur.

Tabulka 54: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr PF(mm)	Tříbodové ohýbání PF (N)	Tloušťka kortikální kosti PF (mm)
KAS	37,87±1,35	3,46±0,28	235,33±27,66	0,71±0,06
KAS-P	38,02±0,77	3,59±0,08	220,50±12,82	0,73±0,05

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

PF, pravý femur.

Biochemická analýza:

Omezený příjem množství potravy neměl vliv na koncentrace kostních markerů v homogenátu kosti u KAS-P vs. KAS (Tabulka 55).

Tabulka 55: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
KAS	2,55±3,20	64,72±43,36	142,04±73,35
KAS-P	2,26±0,19	127,82±79,36	131,84±42,08

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

Denzitometrické vyšetření:

U skupiny KAS-P došlo k nevýznamně nižšímu nárůstu hmotnosti v průběhu pokusu a s tím souvisejícímu nižšímu procentuálnímu obsahu celkového tělesného tuku vs. KAS. V hodnotách kostní minerální hustoty nebyl nalezen rozdíl v žádné ze sledovaných oblastí mezi hodnocenými skupinami (Tabulka 56).

Tabulka 56: Vliv párového krmení u KAS diety vs. KAS skupina na kostní minerální hustotu, tukovou tkáň a hmotnost zvířat.

	BMD femuru (g/cm ²)	BMD bederních obratlů (g/cm ²)	BMD ocasních obratlů (g/cm ²)	Tuková tkáň (%)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
KAS	0,22±0,03	0,24±0,02	0,23±0,01	13,73±4,65	495,50±41,31
KAS-P	0,19±0,02	0,24±0,01	0,24±0,01	10,93±1,27	458,00±18,23

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

KAS, zvířata krmená dietou obohacenou o kasein *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

BMD, kostní minerální hustota.

BCAA vs. KAS-P**Mechanická odolnost kostní tkáně:**

I přes stejné množství přijímané potravy, ale s rozdílným složením bílkovin, měla skupina KAS-P statisticky významně delší levý ($p < 0,001$) i pravý femur ($p < 0,01$), větší průměr pravého femuru ($p < 0,05$) a silnější levý femur při třibodovém ohýbání ($p < 0,05$) ve srovnání se skupinou BCAA (Tabulka 57, Tabulka 58). Síla nutná ke zlomení pravého femuru při třibodovém ohýbání byla také větší u KAS-P vs. BCAA a tlaková odolnost krčku u obou femurů byla naopak menší, ovšem tyto výsledky nebyly statisticky významné.

Tabulka 57: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti levého femuru.

LF	Délka (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,00±1,10	186,50±34,41	122,17±28,39
KAS-P	37,92±0,82**	228,50±15,53*	115,17±16,63

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

LF, levý femur.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

Tabulka 58: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
BCAA	35,32±1,63	3,38±0,19	201,17±33,92	0,70±0,07	133,00±37,13
KAS-P	38,02±0,77**	3,59±0,08*	220,50±12,82	0,73±0,05	123,17±21,53

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

PF, pravý femur.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Biochemická analýza:

Omezený příjem množství potravy neměl vliv na koncentrace kostních markerů u KAS-P vs. BCAA (Tabulka 59).

Tabulka 59: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na koncentraci kostních markerů v kostním homogenátu.

	BALP (µg/l)	CTX-I (ng/l)	PINP (ng/l)
BCAA	1,51±1,50	94,34±44,51	209,86±82,10
KAS-P	2,26±0,19	127,82±79,36	131,84±42,08

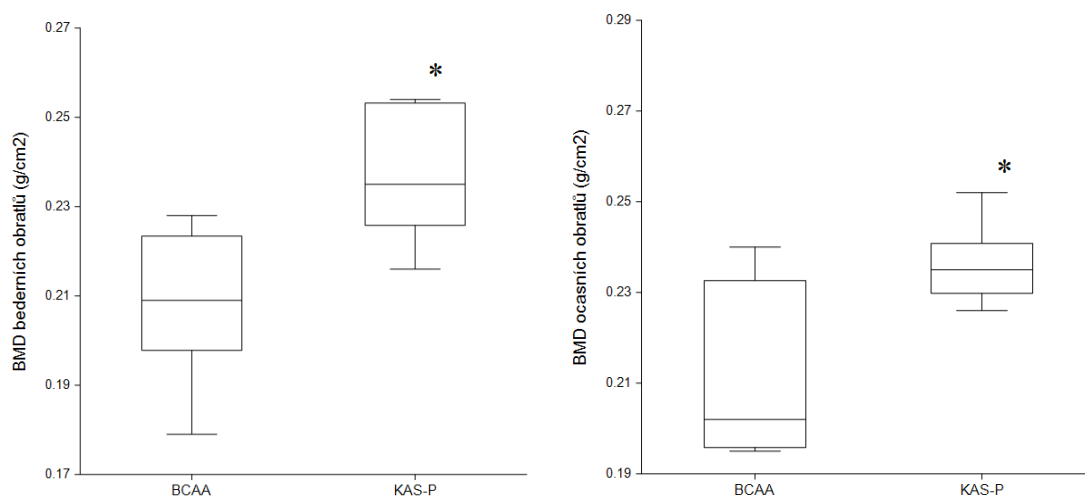
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

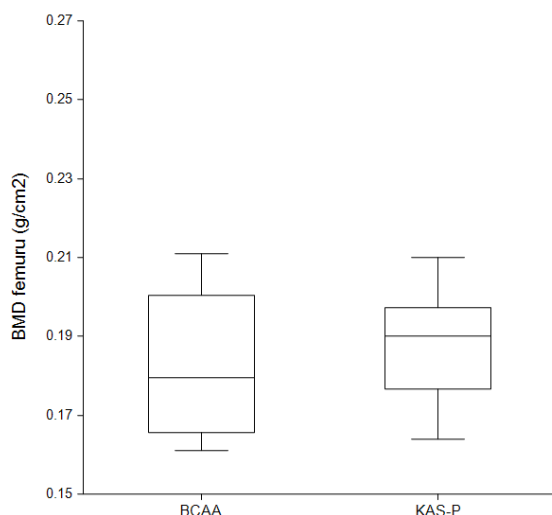
BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

Denzitometrické vyšetření:

Vlivem párového krmení u skupiny KAS-P byly zjištěny vyšší hodnoty kostní minerální hustoty v oblasti bederních ($p < 0,05$) a ocasních obratlů ($p < 0,05$) (Graf 13) a došlo k vyššímu nárůstu tělesné hmotnosti ($p < 0,05$) (Tabulka 60) u skupiny KAS-P ve srovnání s BCAA skupinou. V oblasti femuru nebyla nalezena změna kostní minerální hustoty.

Graf 13: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na BMD v oblasti bederních, ocasních obratlů a v oblasti femuru.





Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

BMD, kostní minerální hustota.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* $p < 0,05$).

Tabulka 60: Vliv párového krmení u KAS diety vs. BCAA skupina na procentuální obsah tukové tkáně a hmotnost zvířat.

	Tuková tkáň (%)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
BCAA	11,97 \pm 1,95	358,83 \pm 73,09
KAS-P	10,93 \pm 1,27	458,00 \pm 18,23*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n=6.

BCAA, zvířata krmená dietou obohacenou o BCAA *ad libitum*; KAS-P, zvířata krmená KAS párově ke skupině BCAA.

Signifikantní rozdíl proti BCAA (* $p < 0,05$).

4.9 Vliv krátkodobého hladovění

4.9.1 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Během experimentu se u rostoucích potkanů rovnoměrně zvyšovala tělesná hmotnost. Spotřeba diety během celého pokusu se významně nelišila. U skupiny hladovějící 24 hodin před ukončením pokusu (ST1-H) došlo k poklesu tělesné hmotnosti ve srovnání s potkany ($p < 0,001$), kteří měli přístup k dietě až do momentu jejich usmrcení (ST1-S) (Tabulka 61).

Tabulka 61: Vliv hladovění u skupiny ST1 na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
ST1-S	515,5±12,8	28,9±0,8
ST1-H	478,7±14,8**	

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti ST1-S (** p<0,001).

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami v žádné ze sledovaných biomechanických vlastností ani pravého ani levého femuru (Tabulka 62, Tabulka 63).

Tabulka 62: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
ST1-S	37,83±0,56	3,59±0,12	139,1±16,12	0,68±0,15	151,50±7,84
ST1-H	38,12±0,66	3,55±0,9	138,8±10,43	0,70±0,03	146,9±21,56

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

LF, levý femur.

Tabulka 63: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Tlaková odolnost krčku (N)
ST1-S	37,91±0,63	3,58±0,15	138,8±12,90	0,70±0,03	147,81±22,70
ST1-H	38,85±2,71	3,51±0,22	140,3±13,59	0,68±0,15	152,65±21,53

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

PF, pravý femur.

Tloušťka kosti levé tibie byla statisticky nevýznamně větší u skupiny hladovějící 24 hodin před usmrcením vs. ST1-S, ostatní parametry nebyly hladověním ovlivněny (Tabulka 64).

Tabulka 64: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.

LT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	40,73±1,51	2,75±0,37	130,50±18,43	0,521±0,009
ST1-H	40,92±0,94	2,71±0,18	126,10±11,41	0,535±0,022

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

LT, levá tibie.

Tloušťka kortikální kosti pravé tibie byla statisticky významně menší u skupiny hladovějící 24 hodin před usmrčením ($p < 0,05$) ve srovnání se skupinou živenou *ad libitum*. Signifikantně nižší ($p < 0,001$) byla síla potřebná ke zlomení pravé tibie torzí u hladovějících potkanů ve srovnání s potkany skupiny ST1-S. Průměr pravé tibie u skupiny ST1-H byl nevýznamně menší a nárůst do délky byl mírně vyšší než u skupiny ST1-S (Tabulka 65).

Tabulka 65: Vliv hladovění u skupiny ST1 na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.

PT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Torze (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
ST1-S	39,71±0,37	2,90±0,28	297,44±13,28	0,541±0,094
ST1-H	41,15±0,82	2,72±0,18	259,50±31,24 **	0,526±0,015 *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

PT, pravá tibie.

Signifikantní rozdíl proti ST1-S (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Biochemická analýza:

Hladovění po dobu 24 hodin nevedlo ke změnám v koncentraci kostních markerů ve srovnání se skupinou bez hladovění (Tabulka 66). Statisticky nevýznamně byl u hladovějící skupiny vyšší PINP, BMP2 a IGF-I. Naopak nevýznamně nižší byly BALP a CTX-I.

Tabulka 66: Vliv hladovění u skupiny ST1 na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.

	PINP (ng/l)	BALP (µg/l)	BMP2 (ng/l)	CTX-I (ng/l)	IGF-I (ng/l)
ST1-S	151,31 (145,51-179,18)	5,27 (3,80-5,48)	22,27±3,66	6745 (5050-9881)	1387 (1096-2850)
ST1-H	154,60 (101,41-237,69)	3,89 (2,28-4,94)	23,65±8,22	6308 (4633-11504)	1497 (973-2195)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, nebo jako medián (25.-75. percentil), n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

Denzitometrické vyšetření:

Vyhodnocením kostní minerální hustoty jsme nenalezli statisticky významné rozdíly mezi skupinou potkanů ST1-S a ST1-H (Tabulka 67).

Tabulka 67: Vliv hladovění u skupiny ST1 na kostní minerální hustotu.

	BMD celková (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD LF (g/cm²)	BMD PF (g/cm²)
ST1-S	0,170±0,028	0,225±0,091	0,203±0,132	0,201±0,161
ST1-H	0,169±0,031	0,221±0,098	0,185±0,072	0,184±0,120

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Po 24 hodinách hladovění jsme našli statisticky významný pokles procentuálního zastoupení tukové tkáně v těle ($p < 0,05$) ve srovnání se skupinou potkanů, která měla přístup k dietě *ad libitum*, nenalezli jsme rozdíl v obsahu svalové tkáně (lean+BMC) (Tabulka 68).

Tabulka 68: Vliv hladovění u skupiny ST1 na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a na obsah tuku.

	Svalová tkáň (lean+BMC) (g)	Tuk (g)	Tuková tkáň (%)
ST1-S	342±28	75±18	17,8±4,1
ST1-H	343±28	51±18	12,6±3,7 *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

ST1-S, zvířata krmená SLD *ad libitum*; ST1-H, zvířata krmená SLD *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti ST1-S (* $p < 0,05$).

4.9.2 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Krátkodobé hladovění o dobu 24 hodin vedlo u skupiny krmené dietou s nadbytkem argininu (Arg-H) k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti ve srovnání se skupinou bez hladovění (Arg-S) ($p < 0,01$). Nebyly ovšem nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami ve spotřebě diety (Tabulka 69), ani v žádném parametru a sledovaných biomechanických vlastností u pravého a levého femuru (Tabulka 70, Tabulka 71).

Tabulka 69: Vliv hladovění u skupiny Arg na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
Arg-S	490,60±18,03	28,85±1,04
Arg-H	471,40±13,58 **	

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti Arg-S (** $p < 0,01$).

Tabulka 70: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Arg-S	37,91±0,60	3,51±0,31	139,4±12,64	150,8±18,11	0,67±0,28
Arg-H	38,31±0,63	3,60±0,15	140,0±12,01	148,50±0,60	0,69±0,03

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

LF, levý femur.

Tabulka 71: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru.

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Arg-S	38,20±0,60	3,53±0,18	139,4±9,4	149,50±17,07	0,69±0,03
Arg-H	38,50±2,11	3,52±0,12	140,1±11,38	151,70±26,56	0,67±0,12

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

PF, pravý femur.

Tloušťka kortikální kosti u pravé tibie byla u hladovějících potkanů statisticky významně nižší než u skupiny bez hladovění ($p < 0,05$) (Tabulka 72). V ostatních hodnocených parametrech a v biomechanických vlastnostech pravých i levých tibií nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami (Tabulka 72, Tabulka 73).

Tabulka 72: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.

PT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Torze (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Arg-S	40,91±0,26	2,73±0,09	272,10±46,98	0,534±0,012
Arg-H	41,69±0,23	2,74±0,15	270,40±29,84	0,522±0,015 *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

PT, pravá tibia.

Signifikantní rozdíl proti Arg-S (* $p < 0,05$).

Tabulka 73: Vliv hladovění u skupiny Arg na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.

LT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Arg-S	40,74±0,91	2,73±0,06	126,20±11,54	0,515±0,012
Arg-H	41,27±0,69	2,74±0,15	129,60±13,32	0,520±0,009

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

LT, levá tibia.

Biochemická analýza:

Krátkodobé hladovění vedlo u skupiny Arg-H ke zvýšení koncentrace IGF-I v kostním homogenátu ve srovnání se skupinou bez hladovění ($p < 0,05$). V ostatních hodnocených markerech by zjištěn mírný, statisticky nevýznamný nárůst koncentrací (Tabulka 74).

Tabulka 74: Vliv hladovění u skupiny Arg na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu.

	PINP (ng/l)	BALP (µg/l)	BMP2 (ng/l)	CTX-I (ng/l)	IGF-I (ng/l)
Arg-S	137,4±22,1	3,74 (1,94-6,47)	22,41 (17,80-26,25)	6735,8 (5302-8670)	905,2 (592-2094)
Arg-H	142,0±24,6	5,86 (1,76-7,04)	23,99 (16,66-29,16)	6128,5 (5132-8147)	5188,6 (2370,6-10469) *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti Arg-S (* p<0,05).

Denzitometrické vyšetření:

Nebyly nalezeny staticky významné rozdíly v kostní minerální hustotě u potkanů, kterým byla 24 hodin před usmrcením odebrána dieta (Arg-H) ve srovnání se skupinou, která přijímala dietu až do doby usmrcením (Arg-S) (Tabulka 75).

Tabulka 75: Vliv hladovění u skupiny Arg na kostní minerální hustotu.

	BMD celková (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD LF (g/cm²)	BMD PF (g/cm²)
Arg-S	0,167±0,056	0,216±0,123	0,183±0,101	0,180±0,113
Arg-H	0,180±0,085	0,226±0,094	0,181±0,139	0,190±0,132

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

U potkanů Arg-H, kterým byla 24 hodin před usmrcením odebrána dieta, došlo ve srovnání s potkany skupiny Arg-S k nesignifikantnímu poklesu procentuálního obsahu tukové tkáně a svalové tkáně (lean+BMC) v těle (Tabulka 76).

Tabulka 76: Vliv hladovění u skupiny Arg na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a tělesný tuk.

	Svalová tkáň (lean+BMC) (g)	Tuk (g)	Tuková tkáň (%)
Arg-S	348±31	57±22	13,8±3,7
Arg-H	335±34	49±6	12,7±1,5

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Arg-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*; Arg-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % argininu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

4.9.3 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin

Mechanická odolnost kostní tkáně:

Vlivem 24 hodinového hladovění před ukončením pokusu s dietou SLD obohacenou o 10 % kreatinu (Krea-H) došlo k významnému poklesu tělesné hmotnosti ve srovnání se skupinou Krea-S krmenou *ad libitum* ($p < 0,001$) (Tabulka 77).

Tabulka 77: Vliv hladovění u skupiny Krea na tělesnou hmotnost na konci pokusu a na spotřebu diety.

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Spotřeba diety (g)
Krea-S	470,00±13,02	31,80±0,55
Krea -H	443,30±11,19**	

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti Krea-S (** $p < 0,001$).

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi skupinou Krea-S a skupinou Krea-H v žádném parametru ani v biomechanických vlastnostech levého ani pravého femuru (Tabulka 78, Tabulka 79).

Tabulka 78: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levého femuru.

LF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Krea-S	38,32±0,90	3,54±0,15	139,50±13,20	148,40±13,30	0,68±0,07
Krea-H	38,48±0,63	3,54±0,18	139,80±11,69	149,30±17,70	0,69±0,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

LF, levý femur.

Tabulka 79: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravého femuru

PF	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tlaková odolnost krčku (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Krea-S	38,10±0,60	3,52±0,12	139,40±7,50	149,40±18,90	0,69±0,09
Krea-H	38,81±1,89	3,65±0,10	139,80±13,20	150,40±17,00	0,70±0,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

PF, pravý femur.

Tloušťka kortikální kosti levé tibie byla statisticky významně větší u skupiny Krea-H ($p<0,001$) ve srovnání se skupinou Krea-S (Tabulka 80). Síly nutné ke zlomení levé tibie u třibodového ohýbání byly u skupiny Krea-H nevýznamně vyšší než u skupiny Krea-S.

Tabulka 80: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně levé tibie.

LT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Krea-S	41,15±0,60	2,69±0,09	126,20±11,35	0,516±0,006
Krea-H	41,42±0,56	2,69±0,15	129,60±13,31	0,528±0,006*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

LT, levá tibia.

Signifikantní rozdíl proti Krea-S (* $p<0,001$).

Všechny sledované parametry, tj. délka, průměr a tloušťka kortikální kosti i torze pravých tibií byly statisticky nevýznamně vyšší u skupiny Krea-H, která 24 hodin hladověla ve srovnání se skupinou Krea-S, která nehladověla (Tabulka 80, Tabulka 81).

Tabulka 81: Vliv hladovění u skupiny Krea na parametry a mechanické vlastnosti kostní tkáně pravé tibie.

PT	Délka (mm)	Průměr (mm)	Torze (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)
Krea-S	40,97±0,60	2,78±0,25	283,500 (272,000-288,000)	0,528±0,012
Krea-H	41,33±0,56	2,87±0,18	285,000 (275,000-293,000)	0,535±0,013

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, nebo jako medián (25.-75. percentil), n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

PT, pravá tibie.

Biochemická analýza:

U hladovějících potkanů došlo k nárůstu koncentrace BMP2 v kostním homogenátu ve srovnání se skupinou, která nebyla vystavena hladovění ($p < 0,05$). U ostatních kostních markerů nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi skupinami (Tabulka 82).

Tabulka 82: Vliv hladovění u skupiny Krea na koncentrace kostních markerů v homogenátu kosti.

	PINP (ng/l)	BALP ($\mu\text{g/l}$)	BMP2 (ng/l)	CTX-I (ng/l)	IGF-I (ng/l)
Krea-S	142,58±48,37	3,838±1,90	18,46±5,20	6693 (4633-8579)	4086±3 840
Krea-H	130,47±0,51	4,49±1,68	23,63±6,05*	6841 (5259-9662)	2531±1 557

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrcením odebraná potrava.

Signifikantní rozdíl proti Krea-S (* $p < 0,05$).

Denzitometrické vyšetření:

U skupiny Krea-H nedošlo ke změně v kostní minerální hustotě v žádné ze sledovaných oblastí, ani v množství svalové tkáně (lean+BMC) a v procentuálním obsahu tělesného tuku ve srovnání se skupinou Krea-S (Tabulka 83, Tabulka 84).

Tabulka 83: Vliv hladovění u skupiny Krea na kostní minerální hustotu.

	BMD celková (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD LF (g/cm²)	BMD PF (g/cm²)
Krea-S	0,178±0,060	0,233±0,107	0,187±0,072	0,189±0,113
Krea-H	0,178±0,044	0,241±0,110	0,194±0,135	0,202±0,173

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

BMD, kostní minerální hustota; LF, levý femur; PF, pravý femur.

Tabulka 84: Vliv hladovění u skupiny Krea na obsah svalové tkáně (lean+BMC) a obsah tuku.

	Svalová tkáň (lean+BMC) (g)	Tuk (g)	Tuková tkáň (%)
Krea-S	317±22	39±90	10,9±1,8
Krea-H	326±21	37±12	9,9±3,4

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=10.

Krea-S, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*; Krea-H, zvířata krmená SLD obohacenou o 10 % kreatinu *ad libitum*, 24 hodin přes usmrčením odebraná potrava.

4.10 Vliv železa a opakovaných odběrů krve

4.10.1 Vliv nadbytku železa v dietě

Nadbytek železa v potravě vedl k nárůstu koncentrace hemoglobinu (Hb) u skupiny FE+, živěné dietou obohacenou o železo v dávce 5 g/kg diety vůči skupině fe (FE+ vs. fe, p<0,01), která byla krmena dietou obohacenou 400 mg elementárního železa na 1 kg diety i vůči skupině SLD, která byla krmena standardní laboratorní dietou (FE+ vs. SLD, p<0,05) (Tabulka 85).

Naopak počty erytrocytů vlivem obou diet se železem poklesly ve srovnání se skupinou bez suplementace železem (FE+ vs. SLD, p<0,001; fe vs. SLD, p<0,05) (Tabulka 85).

Tabulka 85: Vliv železa na počty krevních buněk a koncentraci hemoglobinu.

	Erytrocyty (10¹²/l)	Leukocyty (10⁹/l)	Hb (g/l)
SLD	8,83 (8,56-8,99)	5,03 (3,78-7,06)	147,00 (145,50-150,50)
fe+	8,51 (8,34-8,71) **	7,83 (4,91-8,14)	144,00 (140,50-150,00)
FE+	8,31 (8,20-8,41) ***	6,65 (6,11-7,96)	152,50 (150,25-154,75) ^{oo} *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

Hb, hemoglobin.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).

Signifikantní rozdíl proti fe (^{oo} p<0,01).

Obdobné výsledky jsme našli i při dalších analýzách, kde skupina FE+ měla významně vyšší koncentraci železa v séru jak oproti fe (FE+ vs. fe, $p < 0,001$), tak oproti SLD (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$) (Tabulka 86). Obsahu železa a vápníku v kosti (FE+ vs. SLD, $p < 0,001$; fe vs. SLD, $p < 0,01$) byl u obou skupin krmených dietou obohacenou o železo vyšší ve srovnání s kontrolou (Graf 14).

Tabulka 86: Vliv železa na koncentraci feritinu a železa v séru.

	Feritin (ug/l)	Železo (umol/l)
SLD	2070 (1800-2334)	40,55 (37,25-46,40)
fe+	1766 (1624-2038)	44,80 (35,03-59,98)
FE+	1706 (1333-2210)	75,50 (57,75-85,78) ° *

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

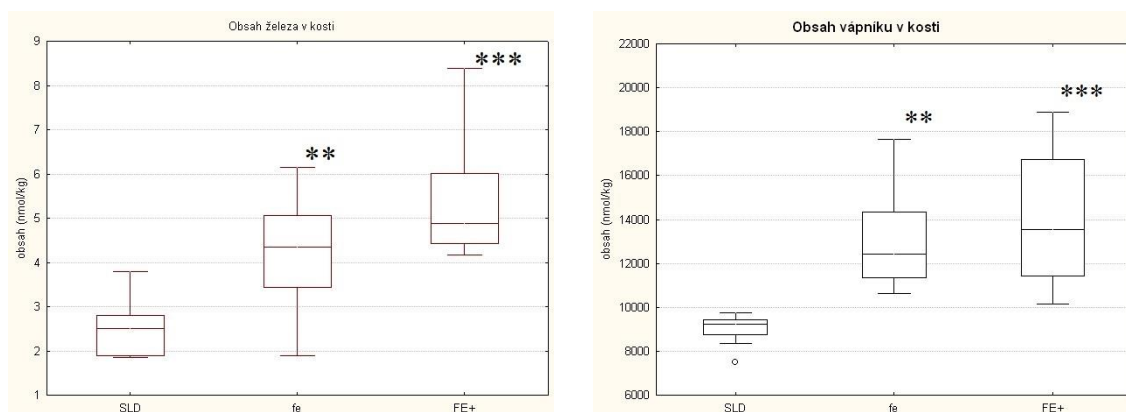
SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

Hb, hemoglobin.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* $p < 0,001$).

Signifikantní rozdíl proti fe (° $p < 0,001$).

Graf 14: Vliv železa na obsah železa a vápníku v kosti.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

Hb, hemoglobin.

Signifikantní rozdíl proti SLD (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Diety s různým obsahem železa nevedly ke změnám v tělesné hmotnosti zvířat, hmotnosti jater (data neuváděna), koncentraci feritinu, koncentraci kostních markerů, hustoty kostního minerálu ani mechanických vlastností kostí (Tabulka 86, Tabulka 87, Tabulka 88, Tabulka 89). Nedošlo ani ke změnám v hodnotách APTT a Quickova testu (data neuváděna).

Tabulka 87: Vliv železa na kostní minerální hustotu a hmotnost zvířat na konci pokusu.

	BMD femuru (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD ocasních obratlů (g/cm²)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
SLD	0,159 (0,149-0,169)	0,214 (0,199-0,225)	0,188 (0,182-0,197)	368,50 (358,50-398,00)
Fe	0,156 (0,144-0,173)	0,198 (0,192-0,215)	0,200 (0,193-0,202)	413,5 (369,75-438,25)
FE+	0,169 (0,155-0,185)	0,202 (0,194-0,218)	0,196 (0,182-0,210)	367,5 (346,75-413,00)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

BMD, kostní minerální hustota.

Tabulka 88: Vliv železa na mechanické vlastnosti kostní tkáně levého a pravého femuru.

	Třibodové ohýbání LF (N)	Tlaková odolnost krčku LF (N)	Třibodové ohýbání PF (N)	Tlaková odolnost krčku PF (N)
SLD	176,50 (170,75-197,75)	120,25 (135,00-152,00)	171,50 (154,00-187,50)	132,00 (125,25-153,75)
fe+	192,00 (179,25-201,00)	136,00 (120,50-164,00)	179,50 (170,75-183,75)	128,50 (101,75-137,50)
FE+	203,50 (183,50-209,75)	116,50 (114,25-156,50)	171,00 (147,25-214,25)	141,50 (126,00-171,50)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

LF, levý femur; PF, pravý femur.

Tabulka 89: Vliv železa na koncentraci kostních markerů v séru.

	OC (ug/l)	CTX-I (ug/l)	PINP (ug/l)
SLD	154,98 (119,07-243,14)	11,96 (9,89-13,72)	38,21 (33,62-42,38)
fe+	182,17 (131,01-221,12)	9,65 (8,08-11,69)	33,95 (28,06-44,45)
FE+	190,96 (167,72-231,66)	10,86 (9,15-15,38)	34,13 (25,36-42,55)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil), n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*.

4.10.2 Vliv opakovaných odběrů krve u jednotlivých typů diet

V této části experimentu byl porovnáván vliv opakovaných krevních odběrů u jednotlivých typů diet. Opakované odběry krve v množství 0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti u skupiny krmené standardní laboratorní dietou (SLD-w) vedly ve srovnání se SLD k poklesu množství erytrocytů ($p < 0,05$) (Tabulka 90) a k navýšení obsahu vápníku v kosti ($p < 0,01$) (Tabulka 91). U skupiny suplementované vyšší dávkou železa (FE+w; 5 g Fe/kg diety) došlo vlivem odběrů krve k poklesu počtu leukocytů ($p < 0,05$) (Tabulka 90) a k poklesu koncentrace železa v séru ($p < 0,05$) (Graf 15).

Tabulka 90: Vliv opakovaných krevních odběrů na počty krevních buněk a koncentraci hemoglobinu.

	Erytrocyty ($10^{12}/l$)	Leukocyty ($10^9/l$)	Hb (g/l)
SLD	8,77±0,24	5,34±1,65	147,38±3,46
SLD-w	8,46±0,13*	3,70±0,35	146,67±2,88
Fe	8,52±0,19	7,08±1,95	144,88±4,82
fe-w	8,33±0,25	5,30±2,21	145,40±3,44
FE+	8,29±0,15	6,85±1,67	152,13±3,64
FE+w	8,20±0,33	4,36±1,41 ^o	151,38±3,85

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

Hb, hemoglobin.

Signifikantní rozdíl proti SLD (* $p < 0,05$).

Signifikantní rozdíl proti FE+ (^o $p < 0,05$).

Vlivem opakovaných krevních odběrů je u všech diet patrný pokles počtu erytrocytů, leukocytů (Tabulka 90), koncentrace feritinu (Tabulka 91), koncentrace železa v séru a obsahu železa v kosti (Graf 15) ovšem bez statistické významnosti. Nedošlo ke změnám v hodnotách APTT a Quickova testu (data neuvedena).

Tabulka 91: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentraci feritinu v séru a obsah vápníku v kosti.

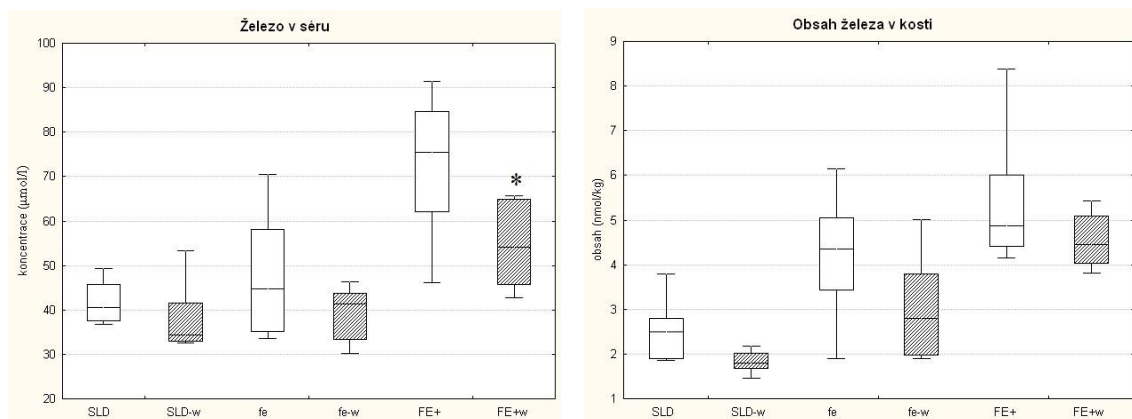
	Feritin v séru (ug/l)	Vápník v kosti (nmol/kg)
SLD	2066,56±302,05	9014,08±740,06
SLD-w	1863,71±199,61	13462,12±3444,44**
Fe	1811,18±204,03	13051,69±2377,89
fe-w	1751,41±352,54	12684,62±1976,60
FE+	1763,15±490,86	14051,40±3257,82
FE+w	1716,46±305,31	13339,07±1654,18

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

Signifikantní rozdíl proti SLD (** p<0,01).

Graf 15: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentraci železa v séru a obsah železa v kosti.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

Signifikantní rozdíl proti FE+ (* p<0,05).

Zvířata s opakovanými krevními odběry vykazují nižší nárůst tělesné hmotnosti ve srovnání s jejich kontrolními skupinami, ovšem výsledky nejsou statisticky významné (Tabulka 92). Nebyly zjištěny rozdíly v hustotě kostního minerálu v hodnocených oblastech u experimentálních skupin (Tabulka 92).

Tabulka 92: Vliv opakovaných krevních odběrů na kostní minerální hustotu a na tělesnou hmotnost zvířat na konci pokusu.

	BMD femuru (g/cm²)	BMD bederních obratlů (g/cm²)	BMD ocasních obratlů (g/cm²)	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)
SLD	0,158±0,011	0,213±0,014	0,190±0,009	370,3±13,8
SLD-w	0,158±0,011	0,206±0,018	0,194±0,012	355,5±14,5
fe	0,158±0,014	0,200±0,010	0,198±0,005	406,3±33,8
fe-w	0,159±0,012	0,201±0,015	0,193±0,009	395,9±44,3
FE+	0,171±0,018	0,206±0,014	0,194±0,016	374,4±37,3
FE+w	0,162±0,013	0,198±0,012	0,189±0,009	354,1±21,7

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

BMD, kostní minerální hustota.

Vlivem odběrů krve pozorujeme nesignifikantní nárůst koncentrace OC u skupin se železem (fe-w, FE+w), koncentrace ostatních markerů kostního metabolismu se vlivem odběrů nezměnily (Tabulka 93).

U žádné z testovaných diet nevedly opakované odběry krve k ovlivnění mechanických vlastností kostí (Tabulka 94).

Tabulka 93: Vliv opakovaných krevních odběrů na koncentrace kostních markerů v séru.

	OC (ug/l)	CTX-I (ug/l)	PINP (ug/l)
SLD	175,47±65,23	11,83±2,30	37,77±5,96
SLD-w	199,88±34,92	11,42±1,69	39,27±6,24
fe	175,41±46,12	9,53±2,18	35,72±9,05
fe-w	210,09±67,86	14,40±7,01	38,76±7,85
FE+	199,18±43,36	11,99±3,37	34,28±8,71
FE+w	214,22±60,96	14,10±4,73	39,69±6,89

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

Tabulka 94: Vliv opakovaných krevních odběrů na mechanické vlastnosti kostní tkáně levého a pravého femuru.

	Třibodové ohýbání LF (N)	Tlaková odolnost krčku LF (N)	Třibodové ohýbání PF (N)	Tlaková odolnost krčku PF (N)
SLD	136,25±15,69	183,38±16,03	137,75±19,09	136,25±15,69
SLD-w	140,71±31,73	195,25±23,74	137,25±28,30	140,71±31,73
fe	123,88±25,31	194,88±24,79	141,88±23,42	123,88±25,31
fe-w	133,71±16,44	191,71±18,95	129,00±19,56	133,71±16,44
FE+	146,88±21,99	195,75±23,69	138,13±43,13	146,88±21,99
FE+w	140,50±28,03	183,13±10,15	159,13±27,00	140,50±28,03

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, n=6.

SLD, zvířata krmená SLD *ad libitum*; fe, zvířata krmená SLD s obsahem železa (400 mg/kg diety) *ad libitum*; FE+, zvířata krmená SLD s obsahem železa (5 g/kg diety) *ad libitum*; w, withdrawal, opakované odběry krve (0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti).

LF, levý femur; PF, pravý femur.

5. Diskuse

5.1 Vliv diety obohacené o glutamin na metabolismus kostí

V našem experimentu byla pro sledování změn kostní hmoty, vzhledem ke svým již známým vlastnostem, vybrána neesenciální aminokyselina glutamin. Glutamin je často využíván jako suplement při vysoce proteokatabolických stavech, jako jsou třeba popáleniny. Glutamin se v těchto případech stává zdrojem dusíku a energie.

V experimentu byla samcům potkanů kmene Wistar po dobu 15 týdnů podávána dieta obohacená o glutamin v dávce 19,7 g doplněná do 100 g standardní laboratorní dietou, abychom mohli sledovat jeho účinek na organismus.

Vlivem diety obohacené o glutamin bylo zjištěno nesignifikantní zlepšení mechanických vlastností femuru. Koncentrace všech hodnocených kostních markerů v kostním homogenátu se zvýšily, naopak v séru došlo k poklesu koncentrací. Jediné statisticky významné navýšení vlivem diety jsme našli u koncentrace CTX-I v kostním homogenátu. Tato hodnota je ovšem příliš vychýlená od standardních hodnot a to je potřeba brát v potaz při jejím hodnocení. Vlivem suplementace glutaminem pozorujeme statisticky nevýznamně menší nárůst tělesné hmotnosti ve srovnání s kontrolou. Což je pravděpodobně způsobeno nižším příjmem potravy. Obsah tuku v organismu byl u suplementované skupiny také naměřen nižší ve srovnání s kontrolou. Ovšem rozdíly mezi skupinami s/bez glutaminu v tělesné hmotnosti a v obsahu tuku v organismu nejsou statisticky významné. Dieta obohacená o glutamin neovlivnila hustotu kostního minerálu ani v jedné ze sledovaných oblastí.

V experimentu Obeid *et al.* (2005) byla potkanům Sprague-Dawley po dobu jednoho týdne podávána dieta obohacená o glutamin v dávce 40 g/kg diety. Autoři zjistili, že glutamin stimuluje syntézu glykogenu v játrech, ale tato syntéza nevede k poklesu příjmu potravy u suplementované skupiny ve srovnání s kontrolou.

Glutamin je pro své obecně známé vlastnosti hojně využíván jako doplněk stravy pro sportovce nebo k léčbě závažných stavů. Z tohoto důvodu se většina autorů zabývala jeho vlivem na svalovou hmotu, játra nebo imunitní systém. Autoři se ovšem jen velmi málo zabývali vlivem glutaminu na kostní hmotu (Ziegler *et al.*, 2002; Mora Lde *et al.*, 2002; Scholz a Schrezenmeir, 2000, Tatara *et al.*, 2004; Tatara *et al.*, 2005; Tatara *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2008; Schürch *et al.* 1998).

Existují ale práce, které se zabývají vztahem alfa-ketoglutarátu (AKG) a kostí, kdy je známo, že AKG je prekurzorem pro syntézu glutamátu a glutaminu.

Ve studiích, kde byl dlouhodobě podáván AKG krocanům (Tatara *et al.*, 2004) a prasnicím (Andersen *et al.*, 2008), byl zaznamenán nárůst kortikální a trabekulární kostní hmoty v tibiai a femuru a také větší mechanická odolnost testovaných kostí. Stejný výsledek jsme zaznamenali také v našem experimentu s glutaminem, i když hodnoty nejsou ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významné. Pozitivní efekt AKG byl prokázán již v krátkodobých experimentech i na denervované tibiai (model experimentální osteopenie) krocanů (Tatara *et al.*, 2005) i na kortikální kosti žeber u neonatálních samců jehňat (Tatara *et al.*, 2007). Tatara *et al.* (2005) prokázal, že podávání AKG vede též ke zvýšení koncentrace prolinu v plazmě, který hraje klíčovou roli v tvorbě kolagenu (Seibel *et al.*, 2005), ale naopak k poklesu koncentrace glutaminu v plazmě.

Osteoblasty i osteoklasty exprimují receptory pro glutamát i jeho transportér do buňky. Aktivace tohoto transportéru na osteoblastech vede k projevům zralosti a s tím spojené expresi diferenciačních markerů Cbfa1 a proteinů kostní matrix. Můžeme se domnívat, že pozitivní vliv suplementace glutaminem v dietě byl zprostředkován jeho deaminací na glutamát, který ovlivňuje anaboličké změny v kostních buňkách pomocí glutamátergí inervace (Andersen *et al.*, 2008).

5.2 Vliv diety obohacené o arginin na metabolismus kostí

V organismu potkanů živěných dietou obohacenou o 10 % argininu po dobu 12 týdnů byl významně snížený procentuální obsah tělesného tuku ve srovnání s kontrolní skupinou. Ovšem nebyly nalezeny rozdíly v nárůstu tělesné hmotnosti ani ve spotřebě diety ve srovnání se skupinou se standardní laboratorní dietou (ST1-S). Pokusy Fouad *et al.* (2013) ukázaly, že příjem L-argininu v potravě snižuje obsah břišního tuku, hladinu cholesterolu a triglyceridů u brojlerů. Autoři prokázali, že za tento pozitivní efekt může snížení exprese jaterní 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA reductázy (HMG-CoA reductáza) a naopak zvýšení srdeční karnitin-palmitoyl transferázy a 13-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. Zvýšený příjem L-argininu v potravě může také vést ke zvýšení hmotnosti a svalové hmoty. Což jsme ovšem v našem experimentu nepotvrdili.

Výsledkem našeho experimentu byl signifikantně menší průměr diafýzy pravé tibie a menší odolnost při třibodovém ohýbání levé tibie. Dále byl pozorován pouze

nevýznamný pokles průměru pravého i levého femuru. S těmito změnami korespondují změny v metabolismu kostí vlivem diety obohacené o arginin - významné snížení kostní novotvorby poklesem PINP a nesignifikantní navýšení CTX-I. Změny biochemických ukazatelů metabolismu kostní tkáně souvisejí s tvorbou matrix, tento děj ale nemusí souviset s následnou mineralizací kostní matrix. V našem experimentu se vliv na kostní minerální hustotu neprojevil v žádné ze sledovaných oblastí.

Naopak Choi a Chang (2013) zjistili, že u velmi mladých rostoucích samic potkanů (75±5 g), dieta obohacená o arginin a taurin zlepšuje kostní kolagenní novotvorbu s pozitivním odrazem také na kostní minerální denzitu.

Naše výsledky jsou tedy částečně v souladu s výsledky studie Baecker *et al.* (2005) na postmenopauzálních ženách, kterým byl po dobu 6 měsíců podáván L-argininhydrochlorid v dávce 3x denně 18 g. Baecker *et al.* (2005) ve své studii předpokládala, že L-arginin, jakožto přirozený prekurzor NO (Castillo *et al.*, 1993), může zvýšit produkci NO a tak pozitivně ovlivnit metabolismus kostí. Ve studii byl sice pozorován nárůst koncentrace PICP, ale nebyly zaznamenány změny v koncentraci IGF-I, hodnotách BMC ani BMD, což dle autorky souvisí s formou podávaného argininu. Arginin má při orálním podávání poměrně špatnou biologickou dostupnost (Bode-Böger *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1993). Domníváme se tedy, že minimální efekt diety obohacené o arginin na stav kostní hmoty, by mohl být způsoben jeho horší dostupností při orálním podáváním.

Naopak v jiných studiích (Blum *et al.*, 2000; Hurson *et al.*, 1995), bylo prokázáno, že podávání L-argininu indukuje uvolňování růstového hormonu, což následně vede ke zvýšení hladin IGF-I v séru. V naší studii nebyl prokázán nárůst koncentrace IGF-I jako bylo zjištěno ve studii Hurson *et al.* (1995), naopak byl zjištěn nevýznamný pokles. Hurson *et al.* (1995) ve své studii podával L-arginin aspartát a Blum *et al.* (2000) používal L-arginin v čisté formě (9 g denně po dobu 1 měsíce). I přes to, že jsme v našem experimentu použili čistou formu L-argininu (10 %) stejně jako Blum *et al.* (2000), naše výsledky se neshodují s jeho nálezy.

Novější práce ovšem naopak naznačují, že podání L-argininu nestimuluje sekreci růstového hormonu, kortizolu, ani IGF (da Silva *et al.*, 2014).

Potkani živení dietou obohacenou o L-arginin měli ve srovnání s kontrolními potkany zhoršené mechanické vlastnosti kostí, tedy odolnost kostí ke zlomení. Tyto změny by mohly být následkem snížené novotvorby a zvýšeného odbourávání kostí a s tím souvisejících změn v mineralizaci kostní tkáně. Vlivem diety by mohlo dojít

k ovlivnění specifických hormonů v organismu, které souvisejí jak s regulací kostního metabolického obratu, mineralizací kostní kolagenní matrix a se změnou distribuce tukové tkáně v organismu potkanů. Klíčová pro experiment ale zůstává celková doba podávání diety, způsob (intermitentní vs. kontinuální) a chemická substance podávaného argininu.

5.3 Vliv diety obohacené o kreatin na metabolismus kostí

Potkani živení 12 týdnů dietou obohacenou o 10 % kreatinu měli nižší množství svalové tkáně a procentuální obsah tuku ve srovnání s kontrolou živenou standardní laboratorní dietou. I přes významný pokles množství svalové tkáně a tuku v organismu potkanů skupiny Krea-S nebyly zaznamenány rozdíly v nárůstu hmotnosti. Těmito výsledky jsme v rozporu s literaturou, kde krátkodobé podávání exogenního 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).

Ve vztahu ke kostní tkáni je vyšší množství svalové tkáně výhodné, neboť brání zhoršování osteoporózy (Crepaldi a Maggi, 2005), snižuje počty pádů osob s negativními důsledky (Clegg *et al.*, 2013). Stejně tak má zvýšený obsah tělesného tuku své protektivní účinky na kost a to jak tím, že tvoří jakousi mechanickou ochranu při pádu, tak i tím že slouží jako depozitum pro estrogeny. Nižší tělesná hmotnost, tedy množství svalové i tukové tkáně v organismu, ovlivňuje kostní tkáň a to tím, že je zde nižší stimulace kostí a s tím souvisí nižší obsah kostní hmoty, a také tím, že depozitum estrogenů je menší (Vyskočil, 2009).

Existuje ale také řada studií, kde autoři nenašli žádný důkaz o pozitivním účinku kreatin-monohydrátu na svalovou sílu (Bemben *et al.*, 2010; Bermon *et al.*, 1998; Eijnde *et al.*, 2003; Eliot, *et al.*, 2008). Zaujalo nás množství podávaného kreatinu: Bemben *et al.* (2010) podával 5 g kreatinu denně, Bermon *et al.* (1998) podával 20 g kreatinu po dobu 5 dní a poté po 3 g kreatinu denně, Eijnde *et al.* (1993) podával dlouhodobě 5 g kreatinu denně.

Vyhodnocením naměřených hodnot kostní minerální hustoty jsme zjistili nevýznamně vyšší hodnoty kostní minerální hustoty celého těla a v oblasti bederních obratlů u skupiny Krea-S a naopak nevýznamně nižší hodnoty v obou hodnocených femurech ve srovnání se skupinou ST1-S.

U potkanů skupiny Krea-S jsme našli nevýznamně nižší mechanickou odolnost kostní tkáně pouze v oblasti tibie, nikoli v oblasti femuru vůči ST1-S. U pravé tibie skupiny Krea-S jsme našli signifikantní pokles tloušťky ve srovnání s ST1-S. V ostatních sledovaných parametrech jak femuru, tak tibie jsme žádné významné změny nezaznamenali. Tento výsledek je v rozporu s výsledky Antolic *et al.* (2007), v jehož studii došlo ke zlepšení parametrů a mechanických vlastností femuru vlivem suplementace kreatinem (zvětšení průměru femuru, odolnost v ohybu). Naopak výsledky měření kostní minerální hustoty v této studii jsou v souladu s našimi výsledky - nárůst v oblasti bederních obratlů a mírný pokles v oblasti femuru. Autor se domnívá, že nárůst BMD v oblasti obratlů souvisí s přítomností metabolicky aktivnější trabekulární kosti v obratlích. Námi zjištěné změny v BMD jsou provázeny poklesem novotvorby kostí, které se organismus potkanů krmených kreatinem snaží kompenzovat mírným nárůstem koncentrace IGF-I v kostním homogenátu ve srovnání se skupinou kontrolní ST1-S. Antolic *et al.* (2007) podával dietu s 2 % kreatinu po dobu 8 týdnů, v našem experimentu jsme podávali 10 % kreatinu po dobu 12 týdnů, což by se mohlo jevit jako vysoká dávka. V naší studii se ale neprojevil nežádoucí účinek nadbytku kreatinu v potravě: jako jsou křeče, nevolnost a průjem (Wallimann *et al.*, 2011).

Zvýšení kostní minerální hustoty v bederní páteři bylo zjištěno také ve studii s muži, kteří dostávali monohydrát kreatinu v dávce 3 g denně po 3 měsíce s 2 měsíční wash-out periodou (Louis *et al.*, 2003; Tarnopolsky *et al.*, 2004). V další studii s muži, kteří byly suplementováni kreatinem v dávce 0,3 g/kg po dobu 5 dní a poté 0,07 g/kg po dobu 12 týdnů, došlo k nárůstu BMD v oblasti horní končetiny (Chilibeck *et al.*, 2005). U ovariektomovaných samic potkanů došlo po 8 týdnech podávání kreatinu v dávce 0,3 g/kg/den k výraznému zvýšení obsahu fosfátu v bederních obratlích, což může svědčit o zlepšování kvality kosti v čase (de Souza *et al.*, 2012). Pozitivní vliv podávaného kreatinu na menší úbytek BMD krčku femuru a nárůst tloušťky kortikální kosti femuru byl zjištěn u postmenopauzálních žen (Beck *et al.*, 2011). U Duchennovy svalové dystrofie a u starších trénujících osob zabránilo podávání kreatinu ztrátám kostní hmoty (Louis *et al.*, 2003; Chilibeck *et al.*, 2005).

Koncentrace všech hodnocených kostních markerů v kostním homogenátu u potkanů Krea-S byly nevýznamně nižší, s výjimkou IGF-I, jehož koncentrace se mírně zvýšila. Domníváme se, že tento útlum kostního obratu, může vést finálně k nárůstu množství kostní tkáně. V ostatních studiích bylo zjištěno, že exogenní podávání kreatinu vede ke sníženému vylučování telopeptidů kolagenu I (Louis *et al.*,

2003; Tarnopolsky *et al.*, 2004; Candow *et al.*, 2008) a k poklesu NTX v séru i v moči (Chilibeck *et al.*, 2005). Prostřednictvím IGF-I, jehož koncentrace v kostním homogenátu u skupiny Krea-S byla v naší studii mírně zvýšená, by se mohl projevit pozitivní vliv kreatinu na kosti. Bylo zjištěno, že kreatin má vliv na stimulaci vývoje a diferenciaci kostních buněk, na zvýšení mineralizace kolagenu, na metabolickou aktivitu a diferenciaci osteoblastů a dalších buněk, které se podílejí na tvorbě kostí a jsou závislé na energii získané prostřednictvím kreatinkinázové reakce (Antolic *et al.*, 2007) a to jak ve studiích *in vitro* (Funanage *et al.*, 1992), tak na zvířatech (Gerber *et al.*, 2005)

Na základě našich výsledků se domníváme, že kreatin podávaný v 10% koncentraci měl spíše negativní vliv na kvalitu kostní tkáně.

5.4 Vliv diety obohacené o větvené aminokyseliny na metabolismus kostí

V našem experimentu byly pro sledování změn ve stavu kostní hmoty, vzhledem ke svým již známým vlastnostem, vybrány větvené esenciální aminokyseliny (BCAA); valin, leucin, izoleucin. Dieta obohacená o BCAA v dávce 28,7 g/100 g SLD (50 % leucinu, 25 % izoleucinu a 25 % valinu) byla podávána samcům potkanů kmene Wistar po dobu 15 týdnů *ad libitum*.

BCAA neboli branched-chain aminoacids jsou hojně využívány jako doplněk stravy u sportovců, tedy zdravých jedinců, ale také u nemocných, nejčastěji v případech popálenin či sepsí. Vliv BCAA na stav kostní hmoty nebyl prozatím příliš studován, většina studií se věnovala spíše vlivu na svalovou hmotu, než na kostní tkáň. Studie, které se jí zabývaly, mají avšak rozporuplné výsledky. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli v tomto experimentu sledovat vliv BCAA na stav kostní hmoty při dlouhodobém podávání diety s vyšším obsahem BCAA u zdravých potkanů kmene Wistar.

Vlivem diety s vyšším obsahem BCAA byl zaznamenán významně menší nárůst obou femurů do délky ve srovnání s kontrolní skupinou SLD. I ostatní parametry, jako je tloušťka kortikální kosti a průměr u pravého femuru, byly nižší ve srovnání s kontrolou, ale výsledky byly nesignifikantní.

Hodnocením mechanických vlastností kostní tkáně byla změřena menší síla nutná ke zlomení femuru při tříbodovém ohýbání, se statistickou významností pouze u levého femuru. Také síla nutná ke zlomení krčku obou femurů, tedy tlaková odolnost krčku, byla zaznamenána nižší ve srovnání s kontrolou, ale statisticky nevýznamně.

Sérové hladiny kostních markerů byly vlivem diety s obsahem BCAA naměřeny nižší, statisticky významně pouze u CTX-I. V kostním homogenátu je zajímavým nálezem nárůst koncentrace PINP, ale bez statistické významnosti.

Dieta BCAA vedla k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti zvířat v průběhu pokusu a s tím souvisejícím nižším obsahem tělesného tuku, tento pokles obsahu tuku v organismu ovšem neměl statistickou významnost. Dieta s větvenými aminokyselinami vedla k signifikantně nižší kostní minerální hustotě v oblasti ocasních obratlů a diafýzy femuru ve srovnání se SLD skupinou.

Jakým způsobem tedy ovlivní vysokoproteinová dieta kost? Vysokoproteinová dieta s obsahem syrovátky, která je zdrojem BCAA, měla ochranný efekt na kostní minerál a navodila nižší hladiny cholesterolu ve srovnání s kontrolou (Aparicio *et al.*, 2011). Potkani kmene Wistar krmení vysokoproteinovou dietou (tvořenou syrovátkou) měli nižší příjem potravy, nižší procento tuku a vyšší nárůst svalů ve srovnání se standardní dietou. I přes prokázanou metabolickou acidózu nedošlo v tomto experimentu k ovlivnění kostní hmoty (Aparicio *et al.*, 2011). Tento efekt vysokoproteinové diety souvisí tedy s potřebou dostatečného příjmu vápníku, draslíku a jiných minerálů společně s proteiny a aminokyselinami (Massey, 2003). Dávka větvených aminokyselin v našem experimentu nebyla vysoká, proto jsme nepředpokládali, že se projeví acidogenita proteinů a dojde k překyselení organismu a k negativním změnám v kostní hmotě. V naší studii jsme neprokázali pozitivní vliv na funkci osteoblastů u zvířat suplementovaných BCAA, i přes to, že v připravovaných dietách bylo také vyvážené množství minerálů.

Zvýšený obsah tuku v organismu je známým „ochráncem“ kostí. 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; Sanderson *et al.*, 1997). U žen navíc probíhá produkce estrogenů v tukové tkáni, která je dalším známým ochranným faktorem (Vyskočil, 2009). Naše výsledky u skupiny BCAA jsou v souladu s těmito tvrzeními. Vlivem diety obohacené o BCAA pozorujeme statisticky významně nižší nárůst tělesné hmotnosti související s nižším příjmem potravy, kratší délku femuru, nižší BMD v oblasti femuru a ocasních obratlů, zhoršené mechanické vlastnosti kostí a nevýznamně nižší koncentrace všech kostních markerů v homogenátu kosti i v séru ve srovnání s kontrolou. U této skupiny se ochranný efekt tuku na kostní tkáň neprojevil z důvodu nízké tělesné hmotnosti a nízkého obsahu tuku v organismu.

Domníváme se tedy, že veškeré námi zjištěné změny v kostní tkáni u skupiny suplementované dietou s obsahem BCAA, které nasvědčují spíše zhoršení stavu kostní hmoty, a výše popsaný vliv hmotnosti na kostní hmotu, jsou vyvolány nejen samotným obsahem BCAA v dietě, ale také sníženým příjmem diety, pravděpodobně kvůli její chuťové neatraktivnosti.

Ve studii de Campos-Ferraz *et al.* (2011) byl zaznamenán nižší příjem potravy a snížený růst u trénujících samců potkanů Wistar ve srovnání s netrénujícími a ještě větší rozdíl byl nalezen u potkanů suplementovaných BCAA. Je obecně známo, že fyzický trénink má anorektické účinky (Eckel a Moore, 2004).

Naopak ve studii Araujo *et al.* (2006) nebyl zjištěn rozdíl v množství přijaté potravy ani v tělesné hmotnosti u samců potkanů Wistar, kteří byli 6 týdnů krmeni dietou suplementovanou BCAA ve srovnání s kontrolou. Tento výsledek je v rozporu s našimi závěry. Rozdíl by mohl vzniknout na základě pohybového tréninku (plavání), kterým byla zvířata v tomto experimentu denně zatížena, a také s dobou podávání experimentální diety (6 týdnů).

Suplementace esenciálními aminokyselinami (leucin, lyzin, izoleucin, fenylyalanin, valin, D/L-methionin, arginin, treonin, histidin a tryptofan) u samic potkanů s ovariektomií a nízkoproteinovou dietou zlepšuje mechanické vlastnosti kostí. Byl pozorován pozitivní efekt jak na kosti s obsahem trabekulární a kortikální kostní tkáně, tak na kosti s převahou kortikální kostní tkáně, což souvisí se zvýšenou plazmatickou koncentrací IGF-I, která stoupá právě vlivem suplementace esenciálními aminokyselinami (Ammann *et al.*, 2002). Podobné výsledky byly prezentovány i u lidí.

V našem experimentu jsme zlepšení mechanických vlastností kostí nepozorovali, což bylo s velkou pravděpodobností způsobeno tím, že jsme v experimentu, na rozdíl od výše popisovaných studií, používali zdravé samce potkanů.

5.5 Vliv diety obohacené o kasein na metabolismus kostí

V našem experimentu byl pro sledování změn ve stavu kostní hmoty vybrán kasein jako proteinová kontrola, tedy jako přírodní bílkovina, v jejímž složení jsou zastoupeny všechny aminokyseliny v ideálním procentuálním složení. Kasein byl podáván zdravým samcům potkanům kmene Wistar po dobu 15 týdnů v dávce 19,7 g kaseinu doplněno SLD do 100 g.

Vysokoproteinová dieta s kaseinem neovlivnila koncentrace kostních markerů v séru ani v kostním homogenátu, kostní minerální hustotu v žádné z hodnocených

oblastí, mechanické vlastnosti kostí ani parametry kostí. U této skupiny zvířat byl pozorován nižší nárůst tělesné hmotnosti a obsah tělesného tuku ve srovnání s kontrolní skupinou, ovšem bez statistické významnosti.

Proteiny mají na kost pozitivní vliv převážně tím, že podporují sekreci IGF-I, klíčového regulátoru kostního metabolismu (Cannalis *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).

Proteiny však mají díky své acidogenitě také negativní vliv na kostní hmotu (Weiss *et al.*, 1981).

Z literatury je známo, že kvalita podávaného proteinu má na stav kostní hmoty malý vliv. Ve studii Mardon *et al.* (2008) u zvířat krmených kaseinem bylo ale prokázáno vyšší množství trabekul, vyšší hodnoty BMD a koncentrace osteokalcinu ve srovnání se skupinou krmenou 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.

Bylo prokázáno, že vysokoproteinová dieta (vaječný albumin, odtučněné sušené mléko) s dostatečným příjmem vápníku nenarušuje až do příjmu proteinů v množství 35 % denního energetického příjmu mechanické vlastnosti kostí u samic potkanů (Pye *et al.*, 2009). Takto sestavená dieta nevedla ke snížení sérového pH a neovlivnila koncentraci vápníku a fosforu. V naší studii byla zvířata krmena dietou se standardním množstvím vápníku a fosforu, tedy dostatečným množstvím těchto minerálů. V souladu se závěry studie Pye *et al.* (2009), nedošlo v našem experimentu k významným změnám mechanických vlastností kostí u skupiny suplementované kaseinem ve srovnání s kontrolou. Pye *et al.* (2009) ale ve své studii navíc zjistil zvýšení obsahu kostního minerálu (g/kg) v tibií, femuru a žebrech vlivem vysokoproteinové diety.

Ve studii Mardon *et al.* (2009) u samců potkanů kmene Wistar ve věku 10 týdnů krmených vysokoproteinovou dietou (26 % kaseinu) po dobu 5 měsíců nebyly nalezeny výrazné změny tělesné hmotnosti, BMD, biomechanických vlastností a kostních remodelačních markerů ve srovnání s kontrolou. Což je v souladu s výsledky naší studie se skupinou suplementovanou dietou s obsahem 19,7 % kaseinu, u které nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou v žádném

ze stanovovaných kostních parametrů. Autoři připisují tento výsledek malým rozdílům v obsahu proteinů ve vysokoproteinové a standardní laboratorní dietě, 26 % vs. 13 %. Tento závěr je v souladu se studií Amanzadeh *et al.* (2003), který prokázal hyperkalcérii a hypocitrátúrii a pomocí histomorfometrické analýzy ztrátu kostní hmoty vlivem suplementace dietou s obsahem 48 % kaseinu u 8 týdenních samců potkanů Sprague-Dawley. Rozdíl v obsahu proteinů byl v této studii mnohem vyšší (48 % vs. 12 %). Není ovšem jasné, zda kostní ztráty jsou způsobené přímo zatížením kyselinami, nebo k nim dochází sekundárně vlivem uvolněných prostaglandinů nebo cytokinů. Velké množství studií bylo prováděno buď s jinými typy proteinů, nejčastěji syrovátkou, která obsahuje BCAA, nebo byla použita kastrovaná zvířata.

Ovariectomované samice nebo orchiektomovaní samci potkanů jsou používáni jako model osteoporózy u lidí. U starších lidí, kteří bývají postiženi osteoporózou, se také velmi často setkáváme současně s proteinovou podvýživou. Bylo proto provedeno velké množství studií na zvířatech i lidech sledujících tento stav a jeho ovlivnění suplementací aminokyselinami a proteiny. Jak již bylo zmíněno je proteinová podvýživa úzce spjata se sníženou koncentrací IGF-I, klíčovým regulátorem metabolismu kostí (Chevalley *et al.*, 2010).

Ve studii se staršími hospitalizovanými pacienty byl zjištěn pokles BMD v krčku femuru, ale skupina s vyšším příjmem proteinů měla vyšší hodnoty BMD na krčku femuru, lepší svalovou sílu a výkon a s tím spojenou schopnost chodit po 4 týdnech hospitalizace (Geinoz *et al.*, 1993; Bonjour, 2005).

Experimentální studie na zvířecích modelech s osteoporózou a proteinovou podvýživou ukázaly, že negativní vliv tohoto stavu na minerální kostní hmotu a sílu může být eliminován suplementací mléčným proteinem. Tento efekt je spojen se zvýšením hladiny IGF-I stimulující kostní novotvorbu (Ammann *et al.*, 2002). V této studii byla potkanům pomocí ovariektomie a sníženého příjmu proteinů (izokalorická dieta s obsahem 2,5 % kaseinu) navozena osteoporóza. Je známo, že ovariektomie vede ke zhoršení BMD a mechanických vlastností převážně v kostech s převahou trabekulární kostní hmoty. Deficit estrogenů příliš nemění vlastnosti kortikální kostní hmoty, alespoň tedy u hlodavců. Snížený příjem proteinů je také spjat s výrazným poklesem BMD, naopak ale hlavně v kortikální kostní hmotě. Což může být vysvětleno tím, že na rozdíl od ovariektomie, deficit příjmu proteinů nevede ke zvýšení hladin IGF-I.

Schürch *et al.* (1998) ve své studii sledovali vliv suplementace mléčnými proteiny u lidí s frakturou krčku kosti stehenní. Suplementovaní pacienti měli také vyšší hladiny IGF-I, sníženou kostní ztrátu v oblasti proximálního femuru a kratší dobu hospitalizace.

Některé studie prokázaly ovšem i negativní vliv proteinů na kost. Vlivem vysokoproteinové diety dochází u žen ke zvýšení kostní resorpce a u zvířat dokonce ke zvýšenému výskytu fraktur předloktí a kyčle (Kerstetter *et al.*, 1999; Feskanich *et al.*, 1996; Sellmeyer *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1981; Talbott *et al.*, 2001).

U potkanů živených nízkoproteinovou dietou poklesla kostní minerální hustota po 8 týdnech především v trabekulární kosti (bederní páteř, proximální a distální femur), ale v kortikální až po 16 týdnech. Tento efekt pravděpodobně souvisí s poklesem hladiny IGF-I, který byl v této studii zjištěn. Pokles byl zaznamenán také v sérové koncentraci osteokalcinu (Bourrin *et al.*, 2000).

V naší studii jsme neprokázali ovlivnění stavu kostní hmoty suplementací kaseinem a to ani pozitivní, ani negativní. Domníváme se, že se neprojevil pozitivní vliv kaseinu na kostní hmotu, protože jsme použili zdravé nekastrované samce potkanů, ani se neprojevil negativně, protože jeho koncentrace v dietě se pohybovaly ve „fyziologických dávkách“.

5.6 Vliv realimentace SLD na metabolismus kostí

5.6.1 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o kasein

Vlivem realimentace standardní laboratorní dietou po dobu 1 týdne po 14 týdnech příjmu diety s nadbytkem kaseinu došlo k významnému navýšení koncentrací kostních markerů, CTX-I v séru i v kostním homogenátu a PINP v séru ve srovnání se skupinou bez realimentace. Zvýšená koncentrace PINP v séru, markeru kostní novotvorby, který vzniká odštěpením z prokolagenu při syntéze nových kolagenních vláken, naznačuje stimulaci tvorby nové kostní matrix. Naopak nárůst koncentrace CTX-I, uvolňujícího se z kosti během degradace kolagenu, jak v séru, tak v kostním homogenátu, hovoří pro zvýšenou resorpci kostí. Domníváme se tedy, že realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety s kaseinem vede ke zvýšení kostního obratu, který se vzhledem ke krátké době trvání realimentace neprojevil ve změně mechanických vlastností kostí, ani v hodnotách kostní minerální hustoty.

5.6.2 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o větvené aminokyseliny

Vlivem 1 týdenní realimentace dietou SLD po 14 týdnech suplementace dietou se zvýšeným obsahem BCAA došlo k významnému nárůstu koncentrace BALP a CTX-I v homogenátu kostí. Hodnoty koncentrací CTX-I v kostním homogenátu měly příliš velký rozptyl, z tohoto důvodu je potřeba tento výsledek opatrně interpretovat.

Realimentace po dobu jednoho týdne vedla k nesignifikantnímu nárůstu tělesné hmotnosti, ale neovlivnila množství tukové tkáně. Kostní minerální hustota, ani mechanické vlastnosti kostí nebyly realimentací ovlivněny. Mírné navýšení celkové tělesné hmotnosti po 1 týdnu realimentace SLD opět svědčí pro horší chuť diety obohacené o BCAA.

Nárůst koncentrace BALP v kostním homogenátu by mohla svědčit pro novou kostní tvorbu a zvýšenou aktivitu osteoklastů. Doba realimentace byla však příliš krátká, aby se její efekt mohl projevit ve změně hodnot parametrů nebo mechanických vlastností kostí nebo ve změně kostní minerální hustoty.

5.6.3 Vliv realimentace SLD po dlouhodobém příjmu diety obohacené o glutamin

Vlivem 1 týdenní realimentace SLD u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem glutaminu po dobu 14 týdnů došlo ke snížení kostní minerální hustoty v oblasti femuru, v ostatních oblastech nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly.

Realimentace neovlivnila parametry ani mechanické vlastnosti hodnocených kostí, nedošlo ke změnám v hladinách kostních markerů ani v séru, ani v kostním homogenátu.

Stejně jako u skupiny BCAA-R je vlivem realimentace u skupiny GLN-R patrný nesignifikantní nárůst tělesné hmotnosti, ovšem také mírný pokles procentuálního obsahu tukové tkáně. Domníváme se ale, že při delší době trvání realimentace SLD by mohlo dojít k ovlivnění i biomechanických vlastností kostí a koncentrací kostních markerů.

5.7 Vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy – vliv párového krmení na metabolismus kostí

V experimentu s párovým krmením bylo hodnoceno, zda sledované parametry kostí, mechanické vlastnosti kostí, koncentrace kostních markerů, kostní minerální

hustota či tělesná hmotnost a množství tělesného tuku je ovlivněno spíše kvalitativním složením diety, či její kvantitou.

Princip párového krmení spočívá v podávání přesně odměřených dávek krmení dle porovnávané skupiny. V našem případě jsme omezili množství podávané standardní laboratorní diety a diety obohacené o kasein dle spotřeby diety zaznamenané u skupiny krmené dietou obohacenou o větvené aminokyseliny (BCAA) *ad libitum*. Tyto skupiny s párovým krmením (SLD-P, KAS-P) jsme porovnávali jak se skupinami krmenými stejnou dietou *ad libitum*, tak se skupinou krmenou dietou BCAA, podle níž bylo určeno množství podávané diety.

Skupinu BCAA jsme jako zdrojovou zvolili z toho důvodu, že jsme u ní v průběhu experimentu zjistili významně snížený příjem potravy. Tento snížený příjem diety obohacené o BCAA mohl pravděpodobně ovlivnit hodnoty některých parametrů porovnávaných s kontrolní skupinou, jako jsou parametry a mechanické vlastnosti kostí, koncentrace CTX-I v séru, kostní minerální hustota v oblasti femuru a ocasních obratlů a tělesná hmotnost.

Při omezeném množství potravy, tedy vlivem párového krmení, bylo u skupiny se standardní laboratorní dietou (SLD-P) ve srovnání se skupinou krmenou stejnou dietou *ad libitum* (SLD) zjištěno statisticky významné zhoršení mechanických vlastností kostí v případě tříbodového ohýbaní u obou femurů, nižší nárůst tělesné hmotnosti a snížení procentuálního obsahu celkového tělesného tuku.

Porovnáme-li párově krmenou skupinu SLD-P se skupinou krmenou dietou obohacenou o větvené aminokyseliny *ad libitum* (BCAA), dojdeme k závěru, že párová skupina SLD-P měla signifikantně lepší parametry kostí, tedy délku obou femurů, a také nárůst tělesné hmotnosti na konci experimentu byl větší. Signifikantní pokles koncentrace PINP a nevýznamný nárůst hladin CTX-I a BALP v kostním homogenátu svědčí spíše pro útlum kostního obratu vlivem dlouhodobého omezení příjmu potravy u SLD-P.

U skupiny s dietou se zvýšeným obsahem kaseinu v párovém krmení (KAS-P) ve srovnání se skupinou krmenou dietou obohacenou o kasein *ad libitum* (KAS) bylo zjištěno zhoršení mechanických vlastností kostí - tlakové odolnosti krčku obou femurů. Nižší nárůst tělesné hmotnosti a obsahu celkového tělesného tuku byl nevýznamný.

Výsledky u skupiny KAS-P ve srovnání se skupinou BCAA jsou ještě zajímavější, tj. lepší parametry kostí, délka obou femurů, průměr PF, větší mechanická

odolnost při tříbodovém ohýbání LF, větší nárůst tělesné hmotnosti a vyšší kostní minerální hustota v oblasti femuru a ocasních obratlů.

Z těchto výsledků vyplývá, že omezení množství přijímané potravy u obou párově krmených skupin zhoršuje parametry kostí, mechanické vlastnosti kostí, dochází k poklesu tělesné hmotnosti a obsahu tělesného tuku ve srovnání se skupinami s příjmem diety *ad libitum*. Významnou roli hraje ovšem i složení podávané potravy.

Jak je známo z předchozích studií, BCAA dieta z důvodu svých horších chuťových vlastností vede k nižšímu příjmu potravy, s následným nižším nárůstem tělesné hmotnosti a ke zhoršení biomechanických vlastností kostí samců potkanů kmene Wistar. Zhoršené vlastnosti kostí u skupiny SLD-P vs. SLD a u KAS-P vs. KAS mohou tedy souviset s množstvím přijaté potravy.

Domníváme se tedy, 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 kosti vedoucí ke kratším a slabším kostem. V souvislosti s nižší hmotností odpadá dobře známý ochranný vliv tuku na kostní tkáň. S poklesem mechanické stimulace kosti by pravděpodobně mohl souviset signifikantní pokles koncentrace markeru kostní novotvorby, PINP v kostním homogenátu, a mírný nárůst koncentrace markeru kostní resorpce, CTX-I v kostním homogenátu. Tyto změny jsou patrné u všech skupin párově krmených ve srovnání se skupinami krmenými *ad libitum* i skupinou BCAA, i když většinou nejsou signifikantní. Výše popsany pokles kostního obratu může být dalším faktorem vedoucím ke zhoršení stavu kostní hmoty pozorovaného u dlouhodobě hladovějících skupin zvířat.

Ovšem velký vliv na pozorované změny v kostní hmotě má také kvalitativní složení diety. Ve srovnání se skupinou BCAA byl u obou párově krmených skupin lepší stav parametrů kostí, mechanických vlastností kostí i větší nárůst tělesné hmotnosti. Jak již bylo zmíněno, nadbytek proteinů v potravě může vést k překyselení organismu. Negativní vliv nadbytku BCAA v potravě na stav kostní hmoty by tedy mohl souviset se vznikem acidózy v organismu. V našem experimentu jsme ovšem nepředpokládali, že zvolená dávka BCAA způsobí v organismu acidózu, a proto jsme tento parametr nesledovali. Důležitý je tedy nejen dostatečný příjem potravy, ale také kvalitativní složení přijímané potravy.

5.8 Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostí

5.8.1 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu standardní laboratorní diety

U skupiny potkanů ST1-H krmených standardní laboratorní dietou po dobu 3 měsíců byl překvapujícím nálezem signifikantní pokles množství tukové tkáně o 5 % po 24 hodin trvajícím hladovění ve srovnání s potkany, kteří měli přístup k potravě *ad libitum*. Všechny hodnocené ukazatele kostního metabolismu byly bez vývoje. Vlivem krátkodobého hladovění byla zjištěna menší tloušťka kortikální kosti pravé tibie. S tímto nálezem by pravděpodobně mohl souviset signifikantní pokles síly nutné ke zlomení tibie v torzi a nesignifikantní pokles síly při tříbodovém ohýbání u hladovějící skupiny ve srovnání s kontrolou.

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 (adipocytokinů) má mnoho dalších důležitých úloh v organismu. Podílí se na řadě různých funkcí, včetně metabolismu kostí (Scotece *et al.*, 2014). Můžeme předpokládat, že tuková tkáň uložená v kostní dřeni bude při hladovění pomáhat obnovení funkce osteoblastů (Devlin, 2011). Úloha osteocytů není vázána jen na kostní tkáň, ale zasahuje i do metabolismu tuků a dokonce i do lymfopoézy (Sato *et al.*, 2013).

V našem experimentu jsme zjistili významný pokles obsahu tuku v těle, ale hodnoty BMD byly téměř nezměněné ve všech sledovaných oblastech. Naše výsledky jsou ve shodě s Rosenem *et al.* (2009), který neprokázal korelace mezi stehenní BMD a množstvím adipocytů u myši. Domníváme se, že při krátkodobém hladovění u potkanů s dostatkem tukové tkáně je kostní tkáň šetřena a není nucena přeměrovat metabolismus kostí ke zvýšené osteoresorpci.

Předpokládáme tedy, že již po 24 hodinovém 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 kostí. Tuto hypotézu bude ještě nutné ověřit.

5.8.2 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o arginin

Ve druhém experimentu byla po dobu 3 měsíců potkanům podávána dieta obohacená o 10 % chemicky čistého argininu, aby bylo možné sledovat jeho účinky v organismu. 24 hodin před usmrcením byla polovině zvířat dieta odebrána a byl sledován účinek náhlého nedostatku argininu na kostní tkáň.

Jak bylo uvedeno výše, dlouhodobý příjem argininu má pozitivní vliv na obsah tuku v organismu (Fouada *et al.*, 2013). U potkanů živených argininem jsou v metabolismu přednostně využívány mastné kyseliny, což může vést k aktivaci receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory PPAR α a PPAR γ (Guerre-Millo *et al.*, 2001), k následné aktivaci FGF21 (Fazeli *et al.*, 2010b) a doprovázené 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. Domníváme se, že dieta bohatá na arginin může imitovat metabolické procesy známé při hladovění preferenčním odbouráváním tuků, přičemž cesta IGF-I v metabolismu kostí není za takové situace aktivní.

Koncentrace IGF-I v kostním homogenátu významně vzrostly teprve po 24 hodinovém hladovění bez diety s argininem. Domníváme se, že tímto nárůstem by mohl být obnoven efekt IGF-I na tvorbu kosti (tj. tendence k vzestupu BALP).

Po 24 hodinovém hladovění jsme pozorovali signifikantní pokles tělesné hmotnosti, ale došlo jen k mírnému poklesu tělesného tuku a svalové hmoty. Proto se domníváme, že vlivem diety obohacené o arginin sice neměla zvířata nadbytečný tuk, který by mohla v době hladovění odbourávat, ale i tak dokázala toto hladovění velmi dobře kompenzovat.

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; Jamal *et al.* 1998) prostřednictvím estrogenové signální cesty NO/cGMP/PKG (proteinkináza G) (Joshua *et al.*, 2014). NO ale také zvyšuje produkci ROS (Angcajas *et al.*, 2014) a ve vysokých hladinách vede ke kostní resorpci (Joiner *et al.*, 2014). Předpokládáme, že u potkanů krměných dietou bohatou na arginin, došlo ke zvýšené tvorbě NO, ale bez konečného pozitivního efektu na kost. Mnohé práce totiž naznačují, že vhodnější než kontinuální podávání NO je jeho intermitentní aplikace (Wimalawansa *et al.*, 1997).

Domníváme se, že hladovění po dobu 24 hodin bylo příliš krátkodobé, aby vedlo k jednoznačným změnám v biomechanických vlastnostech nebo v hodnotách BMD.

5.8.3 Vliv krátkodobého hladovění po příjmu diety obohacené o kreatin

V tomto experimentu byla po dobu 3 měsíců potkanům podávána dieta obohacená o 10 % kreatinu, aby bylo možné sledovat jeho účinky v organismu. Poté byla tato dieta 24 hodin před usmrcením polovině zvířat odebrána a byla sledována reakce kostní hmoty na náhlý nedostatek kreatinu.

V předchozím experimentu jsme zjistili, že potkani živení 12 týdnů dietou obohacenou o 10 % kreatinu měli na konci experimentu nevýznamně nižší tělesnou hmotnost než kontroly živené standardní laboratorní dietou. Domníváme se, že za tuto nižší tělesnou hmotnost je zodpovědné statisticky významně nižší množství tukové tkáně ve srovnání se skupinou ST1-S, přičemž spotřeba diety byla v průběhu pokusu u všech skupin téměř stejná. Neprokázali jsme zlepšení biomechanických vlastností kostí vlivem diety s kreatinem, což je v rozporu s výsledky Antolica *et al.* (2007).

I přesto, že se v naší studii neprojevil nežádoucí účinek nadbytku kreatinu v potravě (Wallimann *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 1998), domníváme se, že v koncentraci 10 % měl kreatin spíše negativní vliv na kvalitu kostní tkáně. Z tohoto důvodu se nám jeví, že krátkodobé vysazení diety bohaté na kreatin se odrazilo v kostní tkáni pozitivně. Je pravděpodobné, že mohly ještě přetrvávat určité zásoby kreatinu nebo jeho sloučenin v těle potkanů a tím oddálit efekt jeho nedostatku. Zhao *et al.* (2002) udává, že myocelulární kreatin může hrát důležitou roli například při hladovění, kdy jsou s jeho využitím minimalizovány katabolické efekty.

Závěr – shrnutí krátkodobého hladovění.

Můžeme se domnívat, že krátkodobé hladovění potkanů vede k poklesu obsahu tukové tkáně, což se může odrazit v metabolismu kostní tkáně. Nelze předpokládat výrazné změny v kostní minerální denzitě, ale jsou zajímavé změny nalezené v koncentracích kostních markerů. Hladověním klesá novotvorba kosti „klasickou“ cestou přes PINP a naopak může být podporována sekrecí IGF-I nebo BMP2.

Zajímavým zjištěním je také nález ztlustění kompakty u potkanů živených dietami obohacenými o arginin nebo kreatin po 24 hodinách hladovění. Může se jednat o otok tkání?

5.9 Vliv železa a opakovaných odběrů krve na metabolismus kostí

Železo je esenciální prvek, jehož nedostatek i nadbytek je pro organismus škodlivý. V našem experimentu jsme zvolili kombinaci podávání diety obohacené o železo o dvou různých koncentracích a opakované odběry krve. Pokusili jsme se navodit situaci podobnou u dobrovolných dárců krve, kteří jsou z důvodů pravidelných ztrát krve často suplementováni právě železem. V našem experimentu jsme sledovali jak vliv samotného železa na kostní tkáň, tak vliv suplementace železem a opakovaných odběrů krve u zdravých samců potkanů kmene Wistar.

5.9.1 Vliv nadbytku železa v dietě

Po dobu 10 týdnů byla potkanům dáována dieta se zvýšeným obsahem železa a to ve dvou různých koncentracích, 400 mg Fe/kg diety, která odpovídá 12násobku množství podávaného průměrnému dospělému člověku a 5 g Fe/kg diety, což odpovídá 150násobku příjmu u člověka.

Vlivem těchto diet se zvýšeným obsahem železa došlo k nárůstu hladin hemoglobinu, koncentrace železa v séru a obsahu železa a vápníku v kosti. Naopak byl pozorován pokles počtu erytrocytů vlivem diety se zvýšeným obsahem železa. Nedošlo ke změnám v tělesné hmotnosti zvířat, v počtu leukocytů, trombocytů, v koncentraci feritinu a v hmotnosti jater.

Vlivem diet se zvýšeným obsahem železa došlo k významnému zvýšení obsahu železa a vápníku v kostní hmotě ve srovnání s kontrolní dietou. Tento nálezn by mohl souviset s myšlenkou Guggenbuhl *et al.* (2008) o vlivu železa na mineralizaci kostí. Autor předpokládá, že železo má přímý vliv na mineralizaci kostí a tím na její kvalitu bez ohledu na buňky, proteiny a enzymy. Tento efekt je pravděpodobně způsoben inhibicí růstu a změnou kvality krystalů hydroxyapatitu *in vitro* (Guggenbuhl *et al.*, 2008). Autor ve své dřívější studii 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, což dle autorů vede k následnému rozvoji osteoporózy. Existují však i studie, kde byla zjištěna pozitivní korelace mezi železem v dietě a BMD v oblasti bederních obratlů, trochanteru, krčku femuru, Wardova trojúhelníku a v celém těle (Harris *et al.*, 2003).

V naší studii nedošlo ke změnám v koncentracích markerů kostního obratu – OC, PINP a CTX-I, v hustotě kostního minerálu, ani v hodnotách biomechanického

testování. Zvýšení hladin jak markerů kostní tvorby, osteokalcinu a alkalické fosfatázy, tak markerů kostní resorpce, močového pyridinolinu a deoxy pyridinolinu a pokles koncentrace parathyroidního hormonu (PTH) pozoroval ve své 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. Což je v souladu s nálezem zvýšeného obsahu železa v kostní tkáni vlivem diety obohacené o železo v našem experimentu. V této studii autor pozoroval ztlustění stěn osteoidu a rozvoj osteomalacie. 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 na dietě) a pomalejší novotvorba kosti pomocí osteoblastů (po 13. týdnech na dietě).

Zvýšené ukládání železa v kostních buňkách, osteoblastech i osteoklastech, zjistil již v roce 1984 Vernejoul *et al.*. Ovšem pouze ukládání železa v osteoblastech vedlo k poklesu počtu a aktivity těchto buněk, ke snížení doplňování (nasedání) osteoblastů na kostní hmotu v místě resorpce a snížená byla i syntéza kolagenu. Tuto myšlenku potvrzuje nález osteoporózy až u 25 % pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) (Valenti *et al.*, 2009). Vliv nadbytku železa na vznik osteoporózy potvrdil ve studii na buněčných kulturách také Yamasaki a Hagiwara (2009).

V naší studii jsme i přes vysoké koncentrace podávaného železa pozorovali pouze zvýšený obsah železa v kosti u obou diet se zvýšeným obsahem železa ve srovnání se skupinou na standardní laboratorní dietě. Ani u jedné ze zvolených koncentrací jsme ale nepozorovali ovlivnění kostní hmoty. Vysvětlením tohoto závěru by mohlo být příliš krátké trvání experimentu (10 týdnů), během něhož se nestihl projevit efekt podávaného železa na vlastnosti kostní hmoty, a také dobrá schopnost kompenzace příjmu nadbytku železa, pravděpodobně omezením jeho vstřebávání z trávicího traktu vzhledem k tomu, že se jednalo o mladé zdravé dospělé samce.

5.9.2 Vliv nadbytku železa v dietě a opakovaných odběrů krve

V našem experimentu byl hodnocen vliv opakovaných odběrů krve na stav metabolismu kostí jak u standardní laboratorní diety, tak u diet se zvýšeným obsahem

železa ve dvou různých koncentracích podávané po dobu 10 týdnů. Opakované odběry krve byly prováděny 1krát týdně v množství 0,5 ml krve na 100 g tělesné hmotnosti

U skupiny se standardní laboratorní dietou jsme vlivem odběrů pozorovali významný pokles počtu erytrocytů a navýšení obsahu vápníku v kosti ve srovnání se skupinou bez odběrů (SLD). Patrný byl pokles počtu leukocytů, koncentrace feritinu, železa v séru a v kosti, ovšem bez statistické významnosti. Tělesná hmotnost zvířat na konci pokusu poklesla jen mírně. Vlivem opakovaných krevních odběrů u SLD diety nedošlo ke změně v hustotě kostního minerálu, k ovlivnění koncentrace kostních markerů ani k ovlivnění mechanických vlastností kostí.

Vlivem suplementace se železem v dávce 400 mg na 1 kg diety byl patrný trend k poklesu počtu erytrocytů, leukocytů, koncentrace feritinu, železa v séru a železa v kosti ve srovnání se skupinou bez odběrů (fe), ovšem žádný z výsledků není statisticky významný. Změny v kostní minerální hustotě se vlivem opakovaných krevních odběrů neprojevily. Nedošlo k ovlivnění mechanických vlastností kostí ani koncentrace kostních markerů.

U skupiny suplementované dietou s obsahem 5 g železa na 1 kg diety byly vlivem opakovaných krevních odběrů zjištěny podobné výsledky. Došlo k významnému poklesu počtu leukocytů a koncentrace železa v séru ve srovnání se skupinou bez odběrů (FE+). Tento pokles je v souladu s výsledky jiných autorů. Ve studii (Cançado *et al.*, 2001) bylo zjištěno, že u dobrovolných dárců krve vedou odběry krve k prevalenci rozvoje deficitu železa v organismu. U žen k tomu vede již jeden jediný odběr, zatímco u mužů až pravidelné odběry (Javadzadeh Shahshashani *et al.*, 2005). V mnoha studiích byl prokázán pozitivní vliv suplementace na úpravu krevního obrazu po odběru krve (Mittal *et al.*, 2006; Maghsudlu *et al.*, 2008; Røsvik *et al.*, 2010). Gurevitch *et al.* (2007) ve své studii potvrdila, že chronické ztráty krve jsou primárním faktorem rozvoje osteoporózy pravděpodobně z důvodu vyčerpání 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 zase stoupá, podporuje zjištění zvýšeného obsahu vápníku v kosti u skupiny se standardní laboratorní dietou a opakovanými odběry krve. U pacientů s hereditární hemochromatózou (HHE) s osteoporózou bylo po provedení léčebné flebotomie prokázáno zlepšení stavu kostní hmoty (nárůst BMD) a to pravděpodobně mobilizací železa z kostí (Valenti *et al.*, 2009).

U dobrovolných dárců krve se k posouzení stavu metabolismu železa a určení počtu bezpečných odběrů ročně jeví jako nejvhodnější sledování koncentrace hemoglobinu a feritinu (Mittal *et al.*, 2006; Røsvik *et al.*, 2010). Změny v těchto parametrech jsme v naší studii nenalezli.

Z našich výsledků je patrné, že zvířata dokázala velmi dobře kompenzovat nadbytek železa přijímaného *per os* jeho sníženým vstřebáváním. Zároveň také dokázala velmi dobře kompenzovat pravidelné krevní ztráty pravděpodobně proto, že se jednalo o zdravé dospělé samce. V naší studii jsme nepozorovali zhoršení stavu kostní hmoty. Hodnoty kostní minerální hustoty, koncentrace kostních markerů a mechanické vlastnosti kostí u potkanů kmene Wistar nebyly dietou s nadbytkem železa a opakovanými odběry krve ovlivněny.

6. Závěr

Prezentovaná disertační práce popisuje nové poznatky získané z našich experimentů o vlivu vybraných složek potravy na metabolismus a mechanické vlastnosti kostní hmoty u samců potkanů kmene Wistar. Práce shrnuje výsledky předchozích studií zabývajících se vlivem výživy na kostní hmotu jak lidí, tak experimentálních zvířat a věnuje se popisu shodných i rozporuplných závěrů. Vzhledem k velmi malému počtu experimentů zabývajících se sledováním vlivu výživy na kostní hmotu, je potřeba ještě dalších studií k objasnění všech aspektů ať již s pozitivním, či negativním vlivem na kostní hmotu.

Zdravým dospělým potkanům kmene Wistar byla podávána dieta obohacená o vybrané proteiny a aminokyseliny. Byl sledován nejen efekt konzumace potravy *ad libitum*, ale také efekt omezeného příjmu potravy nebo stav po krátkodobém hladovění. V dalším experimentu byl sledován efekt diety obohacené o železo, jak s opakovanými krevními odběry, tak bez nich.

Hlavním cílem této práce bylo hodnocení změn mechanických vlastností kostní hmoty, tedy změn jejich parametrů, odolnosti vůči ohybu, tlaku a torzi vlivem dietních změn. Zabývali jsme se také sledováním změn koncentrací vybraných kostních markerů, hustoty kostního minerálu v různých částech skeletu a vyhodnocením změn v tělesných parametrech, jako je tělesná hmotnost, obsah svalové a tukové tkáně.

Shrnutí výsledků získaných z jednotlivých experimentů:

- **Dieta s glutaminem** v dávce 16,6 g/100 g standardní laboratorní diety vedla k navýšení koncentrace CTX-I v kostním homogenátu ve srovnání s SLD. Zvýšení koncentrací ostatních kostních markerů v kostním homogenátu a naopak jejich pokles v séru, zlepšení mechanických vlastností kostní hmoty, nižší nárůst tělesné hmotnosti a nižší spotřeba krmiva po 14 týdnech podávání diety nebyly signifikantní. Neprokázali jsme tedy ani negativní, ani pozitivní vliv diety s glutaminem na stav kostní hmoty.
- **Dieta obohacená o arginin** v 10% koncentraci po dobu 12 týdnů vedla k poklesu procentuálního obsahu tuku ve srovnání s kontrolní skupinou, ovšem bez vlivu na celkovou tělesnou hmotnost. Byl prokázán negativní vliv na kostní hmotu snížením kostní novotvorby a mírným zvýšením odbourávání 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 hustoty kostního minerálu. Efekt suplementace argininem na kostní hmotu byl spíše negativní.

- **Dieta obohacené o kreatin** v 10% koncentraci po dobu 12 týdnů vedla k poklesu množství svalové tkáně a procentuálního obsahu tuku, ovšem tento účinek nebyl provázen nižším nárůstem celkové tělesné hmotnosti. Dieta s kreatinem vedla pouze ke snížení tloušťky kortikální kosti u tibie. Všechny ostatní výsledky, jako pokles mechanické odolnosti tibie, pokles kostního obratu kompenzovaný zvýšením koncentrace IGF-I, byly nevýznamné. Domníváme se tedy, že efekt kreatinu na kost v námi podávané dávce byl spíše negativní.
- **Dieta obohacená o BCAA** v dávce 28,7 g/100 g diety vedla k celkovému zhoršení všech parametrů femurů, významně však jen k nižšímu nárůstu femurů do délky po 15 týdnech na dietě. Toto zhoršení se projevilo nižší odolností femuru v ohybu a mírným snížením odolnosti krčku femuru vůči tlaku. Účinek BCAA se projevilo také poklesem kostního obratu (pokles koncentrace CTX-I v séru). Dieta vedla k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti a ke snížení kostní minerální hustoty v oblasti ocasních obratlů a diafýzy femuru ve srovnání se skupinou SLD. Domníváme se, že všechny výše popsané změny ve stavu kostní hmoty, jsou pravděpodobně vyvolané jak samotnou dietou, tak jejím sníženým příjmem.
- **Dieta obohacená o kasein** v dávce 19,7 g/100 g diety představovala v našem experimentu proteinovou kontrolu. Neprokázali jsme jakékoliv ovlivnění stavu kostní hmoty suplementací dietou s kaseinem po dobu 15 týdnů pravděpodobně z toho důvodu, 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 (navýšení koncentrace CTX-I v séru a v kostním homogenátu, navýšení PINP v séru), který se ale vzhledem k době trvání realimentace nestačil promítnout do změn ve stavu kostní hmoty.
- **Realimentace SLD po příjmu diety s BCAA** trvajícím 1 týden způsobila aktivaci osteoblastů (vzrůst 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**, trvající 1 týden způsobila pokles kostní minerální hustoty v oblasti femuru. Domníváme se, 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 celkového 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 lepší parametry femuru (délka kosti), ale nižší koncentrace PINP v kostním homogenátu svědčí pro sníženou kostní novotvorbu.
- **Párové krmení KAS** způsobilo zhoršení odolnosti krčků femurů vůči tlaku ve srovnání se skupinou KAS krmenou *ad libitum*. Naopak ve srovnání se skupinou BCAA krmenou *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. Domníváme se, že roli zde hraje také kombinace snížené mechanické stimulace kosti a chybějící vliv ochranného efektu tukové tkáně související s omezením příjmu potravy.
- **Krátkodobé hladovění u SLD** způsobilo pokles tělesné hmotnosti, snížení množství tukové tkáně a zhoršení vlastností kostí ve srovnání se skupinou s přístupem k potravě *ad libitum*. Předpokládáme, že již 24 hodin trvající hladovění vede k negativním změnám v kostní tkáni.
- **Krátkodobé hladovění u diety s argininem** vedlo k poklesu tělesné hmotnosti, nikoli však k poklesu obsahu tuku a svalové tkáně v organismu ve srovnání s Arg-S. Zvířata sice neměla nadbytečný tuk, který by mohla v době hladovění odbourávat, ale i tak dokázala hladovění velmi dobře kompenzovat. Domníváme se, že hladovění bylo příliš krátkodobé,

aby vedlo k jednoznačným změnám v biomechanických vlastnostech nebo v hodnotách BMD.

- **Krátkodobé hladovění u diety s kreatinem** způsobilo pokles tělesné hmotnosti, zvětšení tloušťky kortikální kosti tibie a došlo k podpoře kostní novotvorby (zvýšení koncentrace BMP2). Což naznačuje, že vysazení diety bohaté na kreatin má spíše pozitivní vliv na stav kostní tkáně.
- **Železo v dietě** jak v dávce 400 mg/kg tak v dávce 5 g/kg diety podávané po dobu 10 týdnů vedlo k nárůstu hladin hemoglobinu a železa v séru a obsahu železa a vápníku v kosti. Naopak došlo k poklesu počtu erytrocytů. Pravděpodobně z důvodu krátkého trvání experimentu se vliv železa neprojevil změnou stavu kostní tkáně. Svůj vliv zde má i velmi dobrá regulace příjmu nadbytku železa sníženým vstřebáváním z trávicího traktu.
- **Opakované krevní odběry** v množství 0,5 ml krve na 100 g tělesné hmotnosti po dobu 10 týdnů vedly k poklesu počtu erytrocytů a ke zvýšení obsahu vápníku v kosti u skupiny krmené standardní laboratorní dietou. Nedošlo ale k ovlivnění stavu kostní hmoty. Suplementace dietou se železem v dávce 400 mg Fe/kg diety nevedlo k žádným změnám. U skupiny krmené dietou s obsahem 5 g Fe/kg diety došlo vlivem odběrů k poklesu počtu leukocytů a koncentrace železa v séru. Zvířata v našem experimentu odběry krve velmi dobře kompenzovala, proto se domníváme, že opakované odběry krve spolu s doplňováním železa jsou z pohledu na možné změny v kostní hmotě 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 opakovanými odběry krve vedly jen k mírným změnám v kostní tkáni, což nás vede k závěru, že zdravý organismus dokáže tyto vlivy velmi dobře kompenzovat. K rozpoznání mechanismů schopnosti tyto stavy kompenzovat bude potřeba další výzkum.

V této práci prezentované poznatky o vlivu výživy na stav kostní hmoty u potkanů, otevírají další diskusi o vlivu výše uvedených stavů u lidí, ať již u sportovců využívající potravinové doplňky s obsahem proteinů a aminokyselin, tak u dobrovolných dárců krve.

7. Souhrn

Kost má v lidském organismu několik funkcí, jako je funkce opěrná, ochranná, je místem krvetvorby všech typů krevních buněk a také významnou zásobárnou minerálů, jako jsou vápník, hořčík a fosfor. Kost je dynamický orgán, který prodělává po celý život neustálou remodelaci. Proces remodelace zahrnuje kostní novotvorbu, za kterou jsou zodpovědné osteoblasty, a kostní resorpci, za kterou zodpovídají osteoklasty. Neustálá rovnováha mezi těmito ději, tedy mezi osteoblasty a osteoklasty, je udržována pomocí mnoha faktorů. Narušení této rovnováhy, ať už vnitřními nebo vnějšími vlivy, vede k rozvoji kostního onemocnění.

Mezi vnější faktory ovlivňující kvalitu kostní tkáně patří i výživa. V posledních letech je výživě věnována velká pozornost nejen u odborníků, ale také u široké veřejnosti. Bylo provedeno mnoho studií sledujících vliv základní složky potravy, bílkoviny, na celkový stav organismu v době zdraví i v době nemoci. Jen velmi málo je však známo o vlivu těchto látek na stav kostní hmoty.

Dobrovolní dárci krve jsou zdraví dospělí muži i ženy, kteří v pravidelných intervalech, přibližně 4krát ročně, darují krev v množství asi 450 ml. Mnoho těchto dárců je ohroženo nedostatkem železa v organismu, a proto jsou jím často suplementováni. Železo je esenciální prvek, který se v organismu nachází v mikromolárních koncentracích, jak jeho nedostatek, tak jeho nadbytek, jsou pro organismus škodlivé. O vlivu nadbytku i nedostatku železa na celkový stav organismu, stejně tak o vlivu opakovaných odběrů krve, bylo sepsáno mnoho studií. Opět se jich jen několik zabývalo tím, jak tyto stavy ovlivňují kostní hmotu.

Předmětem zájmu předkládané práce bylo sledování vlivu vybraných bílkovin, aminokyselin, železa a vybraných stavů, jako je dlouhodobé omezení příjmu potravy, krátkodobé hladovění a opakované odběry krve, na vlastnosti kostní hmoty. Především byly hodnoceny změny v parametrech kostí jako jsou - délka kosti, průměr kosti, šířka kortikální kosti, a v mechanických vlastnostech kostí - odolnost kosti vůči ohybu, tlaku a torzi. Byly hodnoceny také změny v koncentracích kostních markerů, v hustotě kostního minerálu ve vybraných oblastech skeletu a změny v obsahu svalové a tukové tkáně u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar.

Během doktorského studia jsem se věnovala experimentům hodnotících vliv výše uvedených látek na kost. V 1. experimentu byly samcům potkanů podávány vybrané bílkoviny a aminokyseliny: glutamin, větvené aminokyseliny - valin, leucin

a izoleucin (BCAA), a kasein *ad libitum*. Dále byl sledován vliv týdenní realimentace standardní laboratorní dietou po dlouhodobém podávání diet obohacených o uvedené aminokyseliny a bílkovinu. Jako kontrolní skupina byla zvolena skupina krmená standardní laboratorní dietou (SLD) *ad libitum*. Ve 2. experimentu byl sledován vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy, tedy párového krmení u skupiny krmené standardní laboratorní dietou a kaseinem. Množství podávané potravy odpovídalo skupině krmené větvenými aminokyselinami v experimentu číslo 1. Ve 3. experimentu byl sledován vliv samotné diety obohacené o arginin a kreatin podávané *ad libitum* a také vliv krátkodobého hladovění u těchto skupin. Ve 4. experimentu byl sledován vliv podávání železa v různých koncentracích, jak samotného, tak v kombinaci s opakovanými odběry krve.

V experimentu č. 1 nevyvolala dieta obohacená o glutamin ani o kasein změny v kostní hmotě u zdravých dospělých samců potkanů. Významné ovlivnění kostní hmoty bylo zjištěno u suplementace dietou obohacenou o větvené aminokyseliny; nižší nárůst femurů do délky, snížená odolnost femuru v ohybu, pokles kostního obratu, nižší nárůst tělesné hmotnosti a snížení kostní minerální hustoty v oblasti ocasních obratlů. Toto celkové zhoršení kostního metabolismu by mohlo být způsobeno jak samotným složením diety, tak i sníženým příjmem potravy.

Realimentace SLD vedla sice k navýšení kostního obratu u skupiny živené kaseinem, k aktivaci osteoblastů u BCAA a k poklesu kostní minerální hustoty femuru u glutaminu. Domníváme se ale, že vliv na celkový stav kostní hmoty by se projevil až při dlouhodobějším trvání realimentace.

V experimentu č. 2 jsme se rozhodli sledovat vliv dlouhodobého omezení příjmu potravy, párové krmení podle skupiny BCAA, u skupiny se SLD a s dietou obohacenou o kasein, abychom potvrdili výše uvedenou hypotézu. U obou párových skupin bylo zaznamenáno zhoršení stavu kostní hmoty ve srovnání se skupinami krmenými *ad libitum*. Ovšem v porovnání se skupinou BCAA byl stav kostní hmoty u obou párových skupin lepší. Lze tedy konstatovat, že změny v kostní hmotě souvisí nejen s množstvím přijímané potravy, ale i s jejím kvalitativním složením.

Ve 3. experimentu jsme došli k závěru, že efekt jak argininu, tak kreatinu podávaných *ad libitum* na kost byl spíše negativní, i přesto že se projevil zhoršením odolnosti tibie v ohybu pouze u argininu. Krátkodobé hladovění mělo negativní vliv na kostní tkáň snížením odolnosti tibie v torzi pouze u skupiny krmené SLD. U skupiny

s argininem se hladovění neprojevovalo zhoršením mechanických vlastností kostí, u kreatinu jsme dokonce zaznamenali podporu kostní novotvorby vlivem hladovění.

Opakované odběry krve a železo podávané v nadbytku zdravým samcům potkanům kmene Wistar nevedlo ve 4. experimentu k ovlivnění metabolismu kostní hmoty, ani mechanických vlastností kostí. Důvodem byla zřejmě příliš krátká doba trvání experimentu a velmi dobrá kompenzace tohoto stavu zdravým organismem, pravděpodobně sníženým vstřebáváním železa v trávicím traktu.

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 mohl 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.

Pozitivní vliv suplementace bílkovinami a aminokyselinami v dietě na růst svalové hmoty a regeneraci, bude i nadále hojně využíván jak u zdravých, tak nemocných osob. Stejně tak budou dobrovolní dárci krve i nadále podstupovat opakované odběry krve a budou suplementováni železem. Myslíme si, že jsou nutné další studie, ve kterých by byl sledován vliv těchto situací na kostní tkáň jak u zvířat, tak i u lidí.

8. Summary

A bone has several functions in human body, such as support, protection, place for hematopoiesis of all kinds of blood cells and is also an important reservoir for minerals; calcium, magnesium and phosphorus. The bone is a dynamic organ undergoing a continuous remodeling. The remodeling is a process of both, bone formation performed by osteoblasts and bone resorption performed by osteoclasts. The continuous balance between processes, bone formation and bone resorption, is maintained by many factors. A disruption of this balance, caused either by internal or external factors, results in development of bone disease.

Nutrition is one of the external factors affecting the quality of bone mass. The nutrition is carefully watched by experts as well as by public in the last years. There have been a lot of studies carried out focusing on the effect of the proteins, the basic components of nutrition, on the organism during both health and illness. Only a little is known about the effect of these components on the bone.

Blood donors are healthy adults, men and women, undergoing repeating blood withdrawals, approximately four times a year. They usually lose 450 ml of blood during each collection. Many of blood donors are threatened by the iron deficiency, so they are very often supplemented by iron. Iron is an essential element that occurs in micromolar concentration in the body. Both deficiency and overload are unhealthy for the organism. A lot of studies about the effect of the iron deficiency, overload and repeated blood withdrawals on the organism have been conducted so far. However, only a few of these studies dealt with the effect on the bone mass.

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 in the selected parts of skeleton 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 1st experiment the rats were fed by the chosen proteins and amino acids: glutamine, branched-chain amino acids - valine, leucine and isoleucine (BCAA)

and casein *ad libitum*. Further we monitored the effect of one-week realimentation by standard laboratory diet after long-term supplementation by the diet enriched by the above mentioned protein and amino acids. The group fed by the standard laboratory diet (SLD) *ad libitum* was selected as the control group. In the 2nd experiment the effect of long-term under-nutrition, paired-feeding of the group fed by standard laboratory diet and casein was followed up. The amount of food complied with the group fed by branched-chain amino acids from the 1st experiment. The effect of diet supplemented by arginine and creatine *ad libitum* and the effect of short-term starving was followed up in the 3rd experiment. The 4th experiment followed the effect of iron enriched diet in two different concentrations alone or in combination with repeated blood withdrawals.

In the 1st experiment there was found neither the effect of glutamine nor casein 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 remodeling 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 casein 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 casein group in the 2nd 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 3rd experiment we concluded that the effect of arginine and creatine fed *ad libitum* 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 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 repeated blood withdrawals nor the iron over-supplementation resulted in changes of the bone metabolism and the bone mechanical properties to the healthy adult male of the Wistar rats in the 4th experiment. The good ability to compensate this state (iron supplementation / repeated blood withdrawals) was due to their health (decreased absorption in the gastrointestinal tract) 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 female rats, the subjects with bone or any other diseases or aged subjects could react to these conditions.

The positive effect of supplementation by the proteins and amino acids on muscle growth and regeneration will remain as a benefit for both young and ill subjects. As well as voluntary blood donors will remain undertaking repeated blood withdrawals and will be supplemented by iron. We think that additional studies are necessary in order to follow up the effect of these situations on the bone mass in animals as well as in humans.

9. Literatura

1. ABELLA, E. – FELIU, E. – GRANADA, I. – MILLA, F. – ORIOL, A. – RIBERA, J.M. - SANCHEZ-PLANELL, L. – BERGA, L.I. – REVERTER, J.C. – ROZMAN, C. Bone marrow changes in anorexia nervosa are correlated with the amount of weight loss and not with other clinical findings. *American Journal of Clinical Pathology*, 2002, vol. 118, no. 4, s. 582–588.
2. ADAMS, P.C. - BARTON, J.C. How I treat hemochromatosis. *Blood*, 2010, vol.116, no. 3, s. 317-325.
3. ALVES, C.R. – MURAI, I.H. – RAMONA, P. – NICASTRO, H. – TAKAYAMA, L. – GUIMARÃES, F. – LANCHI, A.H. Jr. – IRIGOYEN, M.C. – PEREIRA, R.M. – GUALANO, B. Influence of creatine supplementation on bone mass of spontaneously hypertensive rats. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2012, vol. 52, no. 3, s. 453-461.
4. 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.
5. 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.
6. ANDERSEN, N.K. – TATARA, M.R. – KRUPAMI, W. – MAJCHER, P. – HARRISON, A.P. The long effect of α -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.
7. ANGCAJAS AB, HIRAI N, KANESHIRO K, KARIM MR, HORII Y, KUBOTA M, FUJIMURA S, KADOWAKI M. Diversity of amino acid signaling pathways on autophagy regulation: a novel pathway for arginine. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014, vol. 446, no. 1, s. 8-14.
8. 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.

9. 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.
10. ARAUJO de, J.A. Jr.- FALAVIGNA, G. – ROGERO, M.M. – PIRES, I.S. – PEDROSA, R.G. – CASTRO, I.A. – DONATO, J. Jr, TIRAPEGUI, J. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. *Life Sciences*, 2006, vol. 79, no. 14, s. 1343–1348.
11. 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.
12. 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.
13. BAGI, C.M. – HANSON, N. – ANDRESEN, C. – PERO, R. – LARIVIERE, R. – TURNER, C.H. – LAIB, A. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: Correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone*, 2006, vol. 38, no. 1, s. 136–144.
14. BECK, T.J. – KOHLMEIER, L.A. – PETIT, 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.
15. BELOBRAJDIC, D.P. – McINTOSH, G.H. – OWENS, J.A. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar rats. *The Journal of Nutrition*, 2004, vol. 134, no. 6, s. 1454-1458.
16. 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.

17. 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.
18. BLUM, A. – CANNON, R.O. III – COSTELLO, R. – SCHENKE, W.H. – CSAKO, G. Endocrine and lipid effects of oral L-arginine treatment in healthy postmenopausal women. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2000, vol. 135, no. 3, s. 231–237.
19. 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.
20. 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.
21. BOSKEY, A.L. – GADALETA, S. – GUNDBERG, C. – DOTY, S.B. – DUCY, P. – KARSENTY, G. Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Analysis of Bones of Osteocalcin-Deficient Mice Provides Insight Into the Function of Osteocalcin. *Bone*, 1998, vol. 23, no. 3, September, s. 187–196.
22. BOURRIN, S. – AMMANN, P. – BONJOUR, J.P. – RIZZOLI, R. Dietary Protein Restriction Lowers Plasma Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), Impairs Cortical Bone Formation, and Induces Osteoblastic Resistance to IGF-I in Adult Female Rats. *Endocrinology*, 2000, vol. 141, no. 9, s. 3149-3155.
23. BRAVENBOER, N. - ENGELBREGT, M.J. – VISSER, N.A. - POPP-SNIJDERS, C. - LIPS, P. The effect of exercise on systemic and bone concentrations of growth factors in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, vol. 19, no. 5, s. 945-949.
24. BROMMAGE, R. – JUILLERAT, M. – JOST, R. Influence of casein phosphopeptide and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats. *Le Lait*, 1991, vol. 71, s. 173–180.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. BUFORD, B.N. – KOCH, A.J. Glycine-arginine-alpha-ketoisocaproic acid improves performance of repeated cycling sprints. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 2004, vol. 36, no. 4, s. 583–587.
29. CAMPBELL, B. – ROBERTS, M. – KERKSICK, C. – WILBORN, C. – MARCELLO, B. – TAYLOR, L. – NASSAR, E. – LEUTHOLTZ, B, - BOWDEN, R. – RASMUSSEN, C. – GREENWOOD, M. – KREIDER, R. Pharmacokinetics, safety, and effects on exercise performance of larginine alpha-ketoglutarate in trained adult men. *Nutrition*, 2006, vol. 22, no. 9, s. 872–881.
30. CANALIS, E. – ECONOMIDES, A.N. – GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, 2003, vol. 24, no. 2, s. 218-235.
31. CANALIS, E. – PASH, J. – VARGHESE, S. Skeletal growth factors. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 1993, vol. 3, no. 3, s. 155-166.
32. 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.
33. 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.
34. CANDOW, D.G. – LITTLE, J.P. – CHILIBECK, P.D. – ABEYSEKARA, S. – ZELLO, G.A. – KAZACHKOV, M. – CORNISH, S.M. – YU, P.H. Low-dose creatine combined with protein during resistance training in older men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2008, vol. 40, no. 9, s. 1645-52.
35. CAO, Y. – FENG, Z. – HOOS, A. – KLIMBERG, V.S. Glutamine enhances gut glutathione production. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1998, vol. 22, no. 4, s. 224–227.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. CLEGG, A. – YOUNG, J. – ILIFFE, S. – RIKKERT, M.O. – ROCKWOOD, K. Frailty in elderly people. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9868, s. 752-62.
42. COHICK, W.S. – CLEMMONS, D.R. The insulin-like growth factors. *Annual Review of Physiology*, 1993, vol. 55, s. 131–153.
43. COLOMBANI, P.C. – BITZI, R. - FREY-RINDOVA, P. – LANGHANS, W. - WENK C. Chronic arginine aspartate supplementation in runners reduces total plasma amino acid level at rest and during a marathon. *European Journal of Nutrition*, 1999, vol. 38, no. 6, s. 263-270.
44. 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.
45. 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.
46. CREPALDI, G. – MAGGI, S. Sarcopenia and osteoporosis: A hazardous duet. *Journal of endocrinological investigation*, 2005, vol. 28, no. 10 Suppl, s. 66-68.
47. 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.
48. 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.
49. DE CAMPOS-FERRAZ, P.L. – RIBEIRO, S.M. - LUZ SDOS, S. – LANCHI, A.H. Jr – TIRAPÉGUI, J. Exercise x BCAA supplementation in young trained rats: what are their effects on body growth? *Journal of Sports Science and Medicine*, 2011, vol. 10, no. 3, s. 483-490.
50. 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.
51. DELANY, A.M. – DURANT, D. – CANALIS, E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Molecular Endocrinology*, 2001, vol. 15, no. 10, s. 1781–1789.
52. DESIDERI, E. – VEGLIANTE, R. – CARDACI, S. – NEPRAVISHTA, R. – PACI, M. – CIRIOLO, M.R. MAPK14/p38 α -dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation. *Autophagy*, 2014, vol. 10, no. 9, s. 1652-1665.
53. DEVLIN, M.J. – CLOUTIER, A.M. – THOMAS, N.A. – PANUS, D.A. – LOTINUN, S. – PINZ, I. – BARON, R. – ROSEN, C.J. – BOUXSEIN, M.L. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, vol. 25, no. 9, s. 2078–2088.
54. 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.
55. DZIEDZIEJKO, V. – SAFRANOW, K. - SŁOWIK-ZYLKA, D. - MACHOY-MOKRZYŃSKA, A. – MILLO, B. – MACHOY, Z. – CHLUBEK, D. Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol. 1752, no. 1, s. 26 – 33.

56. ECKEL, L.A. - MOORE, S.R. Diet-induced hyperphagia in rat is influenced by sex and exercise. *American Journal Physiology - Regulatory Integration Comparative Physiology*, 2004, vol. 287, no. 5, s. R1080-R1085.
57. EIJNDE, 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.
58. 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.
59. 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.
60. FAZELI, P.K. - MISRA, M. - GOLDSTEIN, M. - MILLER, K.K. - KLIBANSKI, A. Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2010b, vol. 95, s. 369-374.
61. FESKANICH, D. - WILLETT, W.C. - STAMPFER, M.J. - COLDITZ, G.A. Protein consumption and bone fractures in women. *American Journal of Epidemiology*. 1996, vol. 143, no. 5, s. 472-479.
62. FOGELHOLM, G.M. - NAVERI, H.K. - KIILAVUORI, K.T. - HÄRKÖNEN, M.H. Low-dose amino acid supplementation: no effects on serum human growth hormone and insulin in male weightlifters. *International Journal of Sport Nutrition*, 1993, vol. 3, no. 3, s. 290-297.
63. 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.

64. FROST, H.M. Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *The Anatomical Record*, 1987, vol. 219, no. 1, s. 1–9.
65. 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.
66. FUNANAGE, 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. GINTY, F. Dietary protein and bone health. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2003, vol. 62, no. 4, s. 867-876.
71. GIUSTINA, A. – MAZZIOTTI, G. – CANALIS, E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, 2008, vol. 29, no. 5, s. 535–559.
72. GLEESON, M. Interrelationship between Physical Activity and Branched-Chain Amino Acids. *The Journal of Nutrition*, 2005, vol. 135, no. 6, s. 1591-1595.
73. GOLUB, E.E. - BOESZE-BATTAGLIA K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 2007, vol. 18, no. 5, s. 444–448.
74. 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.
75. GUERRE-MILLO, M. – ROUAULT, C. – POULAIN, P. – ANDRE, J. – POITOUT, V. – PETERS, J.M. – GONZALEZ, F.J. – FRUCHART, J.C. – REACH, G. – STAELS, B.

- PPAR- α -null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2001, vol. 50, no. 12, s. 2809–2814
76. 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.
77. 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.
78. GUNDBERG, C.M. – GRANT, F.D. – CONLIN, P.R. – CHEN, C.J. – BROWN, E.M. – JOHNSON, P.J. – LEBOFF, M.S. Acute changes in serum osteocalcin during induced hypocalcemia in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1991, vol. 72, no. 2, s. 438-443.
79. GUREVITCH, O. – KHITRIN, S. – VALITOV, A. – SLAVIN, S. Osteoporosis of hematologic etiology. *Experimental Hematology*, 2007, vol. 35, no. 1, s. 128–136.
80. HALE, L.V. – GALVIN, R.J. – RISTELI, J. – MA, Y.L. – HARVEY, A.K. – YANG, X. – CAIN, R.L. – ZENG, Q. – FROLIK, C.A. – SATO, M. – SCHMIDT, A.L. – GEISER, A.G. PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat, *Bone*, 2007, vol. 40, no. 4, s. 1103-1109.
81. 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.
82. 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.
83. HAUSCHKA, P.V. – LIAN, J.B. – GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, vol. 72, no. 10, s. 3925-3929.
84. HELFRICH, M.H. – EVANS, D.E. – GRABOWSKI, P.S. – POLLOCK, J.S. – OHSHIMA, H. – RALSTON, S.H. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone

- and bone cell cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1997, vol. 12, no. 7, s. 1108–1115.
85. 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.
86. HOLECEK, M. – MUTHNY, T. – KOVARIK, M. – SISPERA, L. Simultaneous Infusion of Glutamine and Branched-Chain Amino Acids (BCAA) to Septic Rats Does Not Have More Favorable Effect on Protein Synthesis in Muscle, Liver, and Small Intestine Than Separate Infusions. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2006, vol. 30, no. 6, s. 467-473.
87. HOLEČEK, M. Glutamin a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem-praktický význam jejich metabolických vztahů. *Časopis lékařů českých*, 2005, vol. 14, suppl. 3, s. 9-12.
88. HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. s. 288. ISBN 80-247-1562-7, ISBN 978-80-247-1562-9. Kapitola 8.4, Glutamin, s. 186-188. Kapitola 8.5, Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, s. 188-192. Kapitola 9.3, Metabolismus živin při hladovění, s. 219-223.
89. 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.
90. HOSHI, K. – AMIZUKA, N. - ODA, K. - IKEHARA, Y. – OZAWA, H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 1997, vol. 107, no. 3, s. 183– 191.
91. HUANG, B.K. – GOLDEN, L.A. – TARJAN, G. – MADISON, L.D. – STERN, P.H. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, vol. 15, no. 2, s. 188–197.
92. 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.

93. IKEDA, T. - KASAI, M. - UTSUYAMA, M. - HIROKAWA, K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 2001, vol. 142, no. 4, s. 1418–1426.
94. IMANIPOUR, V. – NADERI, A. – MAHDI, F. – SADEGHI, M. – SHAHEDI, V. The Effects of Supplementary L-Arginine Dietary on Metabolism and Performance in Anaerobic Exercise. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 2012, vol. 2, no. 1, s. 759-762.
95. ISOMURA, H. – FUJIE, K. – SHIBATA, K. – INOUE, N. – IIZUKA, T. – TAKEBE, G. – TAKAHASHI, K. – NISHIHARA, J. – IZUMI, H. – SAKAMOTO, W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology* 2004, vol. 197, no. 2, s. 93–100.
96. ITOH, S. – ITOH, F. – GOUMANS, M.J. - TEN DIJKE, P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry*, 2000, vol. 267, no. 24, s. 6954-6967.
97. IVASKA, K.K. – HENTUNEN, T.A. – VÄÄRÄNIEMI, J. – YLIPAHKALA, H. – PETTERSSON, K. – VÄÄNÄNEN, H.K. Release of Intact and Fragmented Osteocalcin Molecules from Bone Matrix during Bone Resorption in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 18, s. 18361–18369.
98. 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.
99. JAMAL, S.A. – BROWNER, W.S. – BAUER, D.C. - CUMMINGS, S.R. Intermittent use of nitrates increases bone mineral density: The study of osteoporotic fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998, vol. 13, no. 11, s. 1755–1759.
100. JÄMSÄ, T. – JALOVAARA, P. – PENG, Z. – VÄÄNÄNEN, H.K. – TUUKKANEN, J. Comparison of Three-Point Bending Test and Peripheral Quantitative Computed Tomography Analysis in the Evaluation of the Strength of Mouse Femur and Tibia. *Bone*, 1998, v.ol. 23, no. 2, s. 155–161.
101. JÄRVINEN, T.L. – SIEVÄNEH, H. – KANNUS, P. – JÄRVINEN, M. Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Predicting Mechanical Characteristics of Rat Femur. *Bone*, 1998, v.ol. 22, no. 5, s. 551–558.

102. 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.
103. 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.
104. JOINER, D.M. – TAYIM, R.J. – McELDERRY JD, MORRIS, M.D. – GOLDSTEIN, S.A. Aged male rats regenerate cortical bone with reduced osteocyte density and reduced secretion of nitric oxide after mechanical stimulation. *Calcified Tissue International*, 2014, vol. 94, s. 484-494.
105. JOSHUA, J. – KALYANARAMAN, H. – MARATHE, N. – PILZ, R.B. Nitric oxide as a mediator of estrogen effects in osteocytes. *Vitamines and Hormones*, 2014, vol. 96, s. 247-63.
106. KARINCH, A.M. – PAN, M. – LIN, C.M. – STRANGE, R. – SOUBA, W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *The Journal of Nutrition*, 2001, vol. 131, suppl. 9, s. 2535S-8S.
107. KERSTETTER, J.E. – MITNICK, M.E. – GUNDBERG, C.M. – CASERIA, D.M., - ELLISON, A.F. – CARPENTER, T.O. – INSOGNA, K.L. Changes in bone turnover in young women consuming different levels of dietary protein. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999, vol. 84, no. 3, s. 1052–1055.
108. 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.
109. 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.
110. KOMINAMI, T. – ODA K. – IKEHARA Y. Induction of rat hepatic alkaline phosphatase and its appearance in serum: electrophoretic characterization of liver-membranous and serum-soluble forms, *Journal of Biochemistry*, 1984, vol. 96, no. 3, s. 901–911.
111. KOYAMA, I. – ARAI, K. – SAKAGISHI, Y. – IKEZAWA, H. – KOMODA, T. Blood appearance of rat alkaline phosphatase originating from the duodenum in vitro. *Journal of Chromatography*, 1987, vol. 420, no. 2, s. 275– 286.

112. 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.
113. LAMBERT, M.I. – HEFER, J.A. – MILLAR, R.P. – MACFARLANE P.W.. Failure of commercial oral amino acid supplements to increase serum growth hormone concentrations in male body-builders. *International Journal of Sport Nutrition*, 1993, vol. 3, no. 3, s. 298-305.
114. LAWSON, E.A. – MILLER, K.K. – BREDELLA, M.A. – PHAN, C. – MISRA, M. – MEENAGHAN, E. – ROSENBLUM, L. – DONOHO, D.G. – UPTA, R. – KLIBANSKI, A. Hormone predictors of abnormal bone microarchitecture in women with anorexia nervosa. *Bone*, 2010, vol. 46, no. 2, s. 458–463.
115. LECKA-CZERNIK, B. – GUBRIJ, I. – MOERMAN, E.J. – KAJKENOVA, O. – LIPSCHITZ, D.A. – MANOLAGAS, S.C. – JILKA, R.L. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPAR γ 2*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, vol. 74, no. 3, s. 357–371.
116. LEPOLA, V.T. – HANNUNIEMI, R. – KIPPO, K. – LAURIÄÄN, L. – JALOVAARA, P. – VÄÄNÄNEN, H.K. Long-Term Effects of Clodronate on Growing Rat Bone, *Bone*, 1996, vol. 18, no. 2, s. 191-196.
117. LEPOLA, V.T. – VÄÄNÄNEN, H.K. – JALOVAARA, P. The effect of immobilization on the torsional strength of the rat tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1993, vol. 297, s. 55–61.
118. 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.
119. 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.
120. LEPPÄNEN, O.V. – SIEVÄNEN, H. – JOKIHAARA, J. – PAJAMÄKI, I. – KANNUS, P. – COOPER, D.M. – JÄRVINEN, T.L. The effects of loading and estrogen on rat bone growth. *Journal of Applied Physiology*, 2010, vol. 108, no. 6, s. 1737-1744.

121. LEWIS T.V. - DART A.M. - CHIN-DUSTING, J.P. – KINGWELL, B.A. Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, vol. 19, no. 11, s. 2782–2787.
122. LIND, P.M. – LARSSON, S. – JOHANSSON, S. – MELHUS, H. – WIKSTRÖM, M. – LINDHE, Ö. – ÖRBERG, J. Bone tissue composition, dimensions and strength in female rats given an increased dietary level of vitamin A or exposed to 3,3%,4,4%,5-pentachlorobiphenyl (PCB126) alone or in combination with vitamin C. *Toxicology*, 2000, vol. 151, no. 1-3 s. 11–23.
123. 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.
124. 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.
125. MAGHSUDLU, M. – NASIZADEH, S. – TOOGHEH, G.R. – ZANDIEH, T. – PARANDOUSH, S. – REZAYANI, M. Short-term ferrous sulfate supplementation in female blood donors, *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 6, s. 1192-1197.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. MATSUSHIMA, S. – HOSHIMOTO, M. – TORII, M. – OZAKI, K. – NARAMA, I. Iron lactate-induced osteopenia in male Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology*, 2001, vol. 29, no. 6, s. 623–629.
133. MATTILA, P. – KNUUTTILA, M. – KOVANEN, V. – SVANBERG, M. Improved Bone Biomechanical Properties in Rats after Oral Xylitol Administration. *Calcified Tissue International*, 1999, vol. 64, no. 4, s. 340–344
134. MCCANN, R.M. – COLLEARY, G. – GEDDIS, C. – CLARKE, S.A. – JORDAN G.R. – DICKSON, G.R. – MARSH, D. Effect of Osteoporosis on Bone Mineral Density and Fracture Repair in a Rat Femoral Fracture Model. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, vol. 26, no. 3, s. 384–393.
135. MCCONELL, G.K. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2007, vol. 10, no. 1, s. 46–51.
136. 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.
137. 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.
138. MINUTO, F. – PALERMO, C. – ARVIGO, M. – BARRECA, A.M. The IGF system and bone. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2005, vol. 28, 8 Suppl, s. 8–10.

139. MISRA, M. - KLIBANSKI, A. Anorexia nervosa and osteoporosis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2006, vol. 7, no. 1-2, s. 91–99.
140. MISRA, M. – KLIBANSKI, A. Neuroendocrine consequences of anorexia nervosa in adolescents. *Endocrine Development*, 2010, vol. 17, s. 197–214
141. MITTAL, R. – MARWAHA, N. – BASU, S. – MOHAN, H. – RAVI KUMAR A. Evaluation of iron stores in blood donors by serum ferritin. *The Indian Journal of Medical Research*, 2006, vol. 124, no. 6, s. 641-646.
142. 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.
143. MOHAN, S. – BAYLINK, D.J. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Endocrinology*, 2002, vol. 175, no. 1, s. 19-31.
144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. NAZARIAN, A. – ENTEZARI, V. – VARTANIANS, V. – MÜLLER, R. – SNYDER, B.D. An improved method to assess torsional properties of rodent long bones. *Journal of Biomechanics*, 2009, vol. 42, no. 11, s. 1720-1725.
148. NEWSHOLME, E. – HARDY, G. Supplementation of Diets with Nutritional Pharmaceuticals. *Nutrition*, 1997, vol. 13, no. 9, s. 837-839.
149. 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.

150. 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.
151. PAK, C.Y. Pharmacotherapy of kidney stones. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2008, vol. 9, no. 9, s. 1509–1518.
152. PALLOSHI, A. – FRAGASSO, G. – PIATTI, P. – MONTI, L.D. – SETOLA, E. – VALSECCHI, G., GALLUCCIO, E. – CHIERCHIA, S.L. – MARGONATO, A. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *The American Journal of Cardiology*, 2004, vol. 93, no. 7, s. 933–935.
153. PENG, Z. – TUUKKANEN, J. – ZHANG, H. – JÄMSÄ, T., VÄÄNÄNEN, H.K. The Mechanical Strength of Bone in Different Rat Models of Experimental Osteoporosis. *Bone*, 1994, vol. 15, no. 5, s. 523-532.
154. POTTS, J.T. Parathyroid hormone: past and present. *Journal of Endocrinology*, 2005, vol. 187, no. 3, s. 311–325.
155. PRICE, P.A. – OTSUKA, A.A. – POSER, J.W. – KRISTAPONIS, J. – RAMAN, N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1976, vol. 73, no. 5, s. 1447-1451.
156. PYE, K.M. – WAKFIELD, A.P. – AUKEMA, H.M. –HOUSE, J.D. – OGBORN, M.R. – WEILER H.A. A high mixed protein diet reduces body fat without altering the mechanical properties of bone in female rats. *The Journal of Nutrition*, 2009, vol. 139, no. 11, s. 2099–2105.
157. RACEK, Jaroslav: *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9. Kapitola 21, Laboratorní ukazatele kostního metabolismu, s. 191-195.
158. 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.
159. 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.

160. 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.
161. REIJNDERS, C.M. - BRAVENBOER, N. - HOLZMANN, P.J. - BHOELAN, F. - BLANKENSTEIN, M.A. – LIPS, P. In Vivo Mechanical Loading Modulates Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Gene Expression in Rat Osteocytes. *Calcified Tissue International*, 2007, vol. 80, no. 2, s. 137-143.
162. RESHEF, L. – OLSWANG, Y. – CASSUTO, H. – BLUM, B. – CRONIGER, C.M. – KALHAN, S.C. – TILGHMAN, S.M. – HANSON, R.W. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 33, s. 30413–30416.
163. RIGGS, B.L. – TSAI, K.S. – MANN, K.G. Effect of acute increases in bone matrix degradation on circulating levels of bone-Gla protein. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1986, vol. 1, no. 6, s. 539-542.
164. RISSANEN, J.P. – SUOMINEN, M.I. – PENG, Z. – MORKO, J. – RASI, S. – RISTELLI, J. – HALLEEN, J.M. Short-Term Changes in Serum PINP Predict Long-Term Changes in Trabecular Bone in the Rat Ovariectomy Model. *Calcified Tissue International*, 2008, vol. 82, no. 2, s. 155–161.
165. ROSEN, C.J. - ACKERT-BICKNELL, C. – RODRIGUEZ, J.P. – PINO, A.M. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 2009, vol. 19, no. 2, s. 109–124.
166. 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.
167. SANDERSON, J.P. – BINKLEY, N. – ROECKER, E.B. – CHAMP, J.E. – PUGH, T.D. – ASPNES, L. – WEINDRUCH, R. Influence of fat intake and caloric restriction on bone in aging male rats. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Science and Medical Science*, 1997, vol. 52, no. 1, B20–B25.
168. SATO, M. – ASADA, N. – KAWANO, Y. – WAKAHASHI, K. – MINAGAWA, K. – KAWANO, H. – SADA, A. – IKEDA, K. – MATSUI, T. – KATAYAMA, Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metabolism*, 2013, vol. 18, no. 5, s. 749-58.

169. 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.
170. SCHOLZ-AHRENS, K.E. – SCHREZENMEIR, J. Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *The British Journal of Nutrition*, 2000, vol. 84, Suppl 1, s. 147-153.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. SELLMAYER, 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.
175. SHIMOMURA, Y. – YAMAMOTO, Y. – BAJOTTO, G. – SATO, J. – MURAKAMI, T. – SHIMOMURAN, 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.
176. SMITH, S.A. – MONTAIN, S.J. – MATOTT, R.P. – ZIENTARA, G.P. – JOLESZ, F.A. – FIELDING, R.A. Creatine supplementation and age influence muscle metabolism during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 1998, vol. 85, no. 4, s. 1349-1356.
177. ŠTĚPÁN, Jan. *Osteoporóza v praxi*. Praha: TRITON, 1997. 156 s. ISBN 80-85875-50-0. Kapitola 5.4.1, Osteodenzitometrie (Měření kostní hmoty). s. 56.
178. STEVENS, B.R. – GODFREY, M.D. – KAMINSKI, T.W. – BRAITH, R.W. High-intensity dynamic human muscle performance enhanced by a metabolic

- intervention. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2000, vol. 32, no. 12, s. 2102–2108.
179. STEWART, C.E. - ROTWEIN, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiology Reviews*, 1996, vol. 76, no. 4, s. 1005–1026.
180. 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.
181. STRÖMBERG, L. – DALEN, N. Experimental measurement of maximum torque capacity of long bones. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 1976, vol. 47, no. 3, s. 257-63.
182. 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.
183. TAKADA, Y. – KOBAYASHI, N. – MATSUYAMA, H. - KATO, K. – MASATOSHI, Y. – MASAYOSHI, K. – SEIICHIRO A. Whey protein suppresses the osteoclast-mediated bone resorption and osteoclast cell formation. *International Dairy Journal*, 1997, vol. 7, no. 12, s. 821-825.
184. 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.
185. 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.
186. TATARA, M.R. – BRODZKI, A. – KRUPSKI, W. – SLIWA, E. – SILMANOWICZ, P. – MAJCHER, P. – PIERZYNOWSKI, S.G. – STUDZIŃSKI, T. Effect of α -Ketoglutarate on Bone Homeostasis and Plasma Amino Acids in Turkeys. *Poultry Science*, 2005, vol. 84, no. 10, s. 1604-1609.

187. TATARA, M.R. – PIERZYNOWSKI, S.G. – MAJCHER, P. – KRUPSKI, W. – BRODZKI, A. – STUDZINSKI, T. Effect of alphaketoglutarate (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.
188. 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.
189. TEUCHER, B. - MAJSAK-NEWMAN, G. – DAINTY, J.R. – McDONAGH, D. – FITZGERALD, R.J. - FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 84, no. 1, s. 162–166.
190. TURNER, C.H. – BURR, D.B.: Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial. *Bone*, 1993, vol.14, no.4, s. 595-608.
191. 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.
192. VAN'T HOF, R.J. – RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, vol. 103, no. 3, s. 255-261.
193. VEAL, E.A. – DAY, A.M. – MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 2007, vol. 26, no. 1, s. 1-14.
194. 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.
195. VIGUET-CARRIN, S. – GARNERO, P. – DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 2006, vol. 17, no. 3, s. 319-336.
196. 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.

197. 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.
198. WANG, T. – HUNG, C.C. – RANDALL, D.J. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annual Review of Physiology*, 2006, vol. 68, s. 223–251.
199. WANG, X. – BANK, R.A. – TEKOPPELE, J. M. – AGRAWAL, C. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, vol. 19, no. 6, s. 1021-1016.
200. WEINBERG, E.D. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *BioMetals*, 2006, vol. 19, no. 6, s. 633-635.
201. WEINBERG, E.D. Role of iron in osteoporosis. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 2008, vol. 6, suppl. 1, s. 81-85.
202. 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.
203. WHEATER, G. – ELSHAHALY, M. – TUCK, S.P. – DATTA, H.K. - VAN LAAR, J.M. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine*, 2013, vol. 11, s. 201.
204. WHYTE, M.P. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocrine Reviews*, 1994, vol. 15, no. 4, s. 439-461.
205. WILNDMUELLER, H.G. – SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine, *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, vol. 249, no. 16, s. 5070–5079.
206. 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.
207. YAMASAKI, K. – HAGIWARA, H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicology Letters*, 2009, vol. 191, no. 2-3, s. 211–215.
208. 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.

209. ZHAO, C.R. – SHANG, L. – WANG, W. – JACOBS, D.O. Myocellular creatine and creatine transporter serine phosphorylation after *starvation*. *The Journal of Surgical Research*, 2002, vol. 105, no. 1, s. 10-16.
210. ZHAO, Y. – MARTIN, B.R. – WASTNEY, M.E. – SCHOLLUM, L. – WEAVER, C.M. Acute versus chronic effects of whey proteins on calcium absorption in growing rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 2005, vol. 230, no. 8, s. 536–542.
211. ZHENG, H. – CABLE, R. – SPENCER, B. – VOTTO, N. – KATZ, S.D. Iron Stores and Vascular Function in Voluntary Blood Donors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, vol. 25, no. 8, s. 1577-1583.
212. 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.
213. ZIEGLER, T.R. Glutamine supplementation in bone marrow transplantation. *The British Journal of Nutrition*, 2002, vol. 87, Suppl. 1, s. 9–15.
214. ZIVNA, H. – ZIVNY, P. – VOKURKOVA, D. – SVEJKOVSKA, K. – PALICKA, V. The effect of chronic iron losses on liver regeneration in male and female rats. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, 2010, vol. 154, no. 2, s. 153-158.