

Vliv vysokoproteinové diety a diety se zvýšeným obsahem glutaminu na metabolismus kostí potkanů

K. JOSEFOVÁ¹, I. GRADOŠOVÁ¹, H. ŽIVNÁ³, K. DOUBKOVÁ¹, M. HOLEČEK²,
P. ŽIVNÝ¹, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a FN Hradec Králové

²Ústav fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, LF v Hradci Králové

³Radioizotopové laboratoře a Vivárium, Univerzita Karlova v Praze, LF v Hradci Králové

SOUHRN

K. Josefová, I. Gradošová, H. Živná, K. Doubková, M. Holeček, P. Živný, V. Palička: **Vliv vysokoproteinové diety a diety se zvýšeným obsahem glutaminu na metabolismus kostí potkanů**

Cílem studie bylo sledovat vliv vysokoproteinové diety a diety obohacené o glutamin na metabolismus kostí u potkanů.

Materiál a metody: Samci potkanů kmene Wistar byli rozděleni do 3 skupin po 6 zvířatech a po dobu 16 týdnů krmeni různými dietami. 1. kontrolní skupina (KO): standardní laboratorní dieta (SLD), 2. skupina (HPD): SLD obohacená o kasein a 3. skupina (GLN): SLD obohacená o glutamin. V séru byly stanoveny ukazatele kostní novotvorby – osteokalcin (OC) a N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) a ukazatel kostní resorpce – C-terminální telopeptid kolagenu I (ICTP). Kostní minerální hustota (BMD) byla změněna denzitometricky (DXA).

Výsledky: Koncentrace ICTP u GLN poklesla o 33 % ($p < 0,05$), koncentrace OC, PINP a BMD ocasních obratlů byly mírně sníženy, naopak BMD femuru byla mírně zvýšená vs. KO. Hodnoty ICTP, PINP a BMD ocasních obratlů u HPD také mírně poklesly vs. KO.

Závěr: Skupiny GLN a HPD měly snížené hodnoty ukazatelů kostního obratu, které se projeví poklesem BMD ocasních obratlů.

Klíčová slova: glutamin, osteokalcin, N-terminální propeptid prokolagenu I, C-terminální telopeptid kolagenu I, kostní denzita

SUMMARY

K. Josefova, I. Gradosova, H. Zivna, K. Doubkova, M. Holecek, P. Zivny, V. Palicka: **Effect of high-protein diet and high-glutamine diet on bone metabolism in rats**

The aim of this study was to investigate the effect of high-protein and high-glutamine diet on bone metabolism in rats.

Material and methods: Male Wistar rats were divided into 3 groups of 6 animals and for 16 weeks were fed different diets. 1. group (KO): standard laboratory diet (SLD), 2. group (HPD): high-protein diet with casein, 3. group (GLN): glutamine-enriched diet. We assayed marker of bone resorption – C terminal telopeptide of collagen I (ICTP) and markers of bone formation- osteocalcin (OC) and N-terminal propeptide of procollagen I (PINP) by enzyme immunoassay (ELISA). Bone mineral density (BMD) was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA).

Results: Concentration of ICTP significantly ($p < 0.05$) decreased by 33 % in GLN vs. KO. Concentration of OC, PINP and BMD in tail decreased, BMD in femur increased in GLN vs. KO and in HPD decreased ICTP, PINP and BMD in tail vs. KO, but not significantly.

Conclusion: GLN and HPD groups had decreased markers of bone turnover which contributed to decreased in tail BMD.

Keywords: glutamine, osteocalcin, N-terminal propeptide of procollagen I, C-terminal telopeptide of collagen I, bone density

Osteologický bulletin 2010; 15(1):3–8

Adresa: Mgr. Klára Josefová, Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: svejkovskak@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 18. 12. 2009

Přijato k tisku: 9. 3. 2010

Úvod

Vysokoproteinová dieta (high-protein diet, HPD) je dieta se zvýšeným obsahem proteinů, např. kaseinu, mléčných proteinů nebo proteinů ze syrovátky, ale patří sem také dieta obohacená o glutamin (GLN) nebo větvené aminokyseliny, jako jsou valin, leucin a isoleucin. Suplementace proteinů se využívá nejen k regeneraci a růstu svalové hmoty a ke zlepšení fyzického výkonu v kulturistice [1] nebo v atletice [2], ale také k léčbě závažných proteokatabolických stavů, jako jsou popáleniny, krvácení, sepse [3] a též u pacientů po transplantaci kostní dřeně [4,5].

Z těchto důvodů se autoři mnoha studií zabývají vlivem HPD na syntézu proteinů v kosterním svalstvu, játrech a zejména na její vliv na imunitní systém. Zatím ale bylo provedeno jen několik studií sledujících vliv HPD na kostní hmotu, a to jak u zdravých, tak nemocných zvířat či lidí [4–11].

Kasein je fosfoprotein mléka, který vytváří během trávení kaseinové fosfopeptidy, u kterých se předpokládá, že usnadňují absorpci vápníku a stimulují mineralizaci kosti [6].

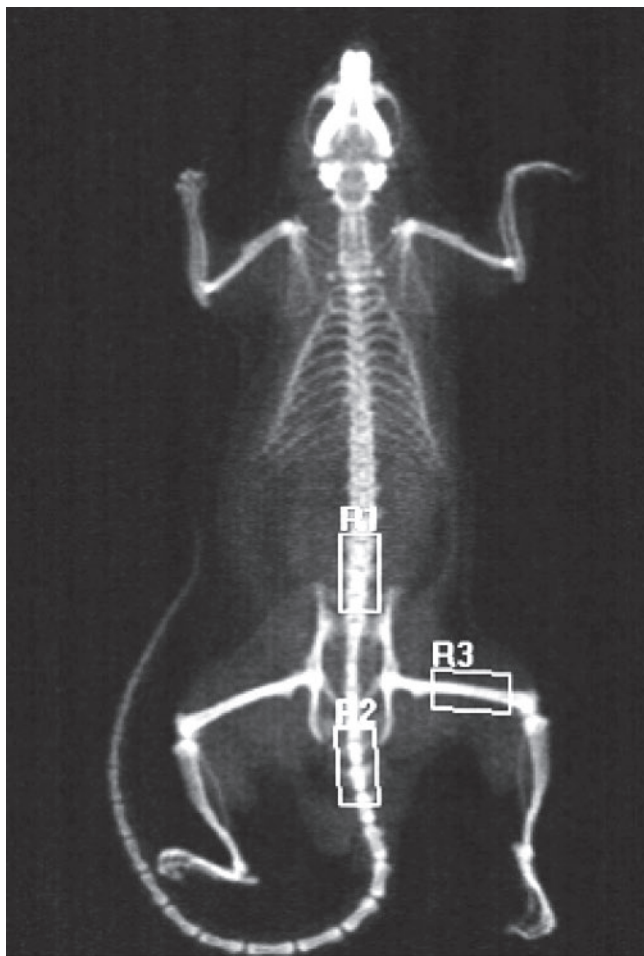
Glutamin je aminokyselina neesenciální, která je součástí proteinů lidského těla. Podílí se na udržování dusíkové rovnováhy.

nováhy v organizmu a má také významnou funkci při detoxikaci amoniaku [12]. Glutamin poskytuje dusík pro řadu biosyntéz, slouží jako prekurzor pro syntézu purinových a pyrimidinových nukleotidů a nukleových kyselin, jako je ATP [13]. Glutamin je prekurzorem pro syntézu antioxidantu glutathionu, který chrání buňky před působením volných radikálů [5,14].

Kostní metabolismus je běžně hodnocen stanovením koncentrací kostních markerů v plazmě nebo v séru. Jako základní ukazatel pro hodnocení kostní resorpce byl stanoven

Obr. 1

Denzitometrický sken potkana s vyznačenými oblastmi měření BMD



Tabulka 1

Hodnoty kostní minerální hustoty (BMD)

KO – kontrolní skupina, HPD – skupina s vysokoproteinovou dietou, GLN – skupina s dietou se zvýšeným obsahem glutaminu, R1 – bederní obratle, R2 – ocasní obratle, R3 – stehenní kost

BMD (g/cm ²)	KO	HPD	GLN
R1	0,231 ± 0,014	0,236 ± 0,020	0,233 ± 0,019
R2	0,245 ± 0,022	0,230 ± 0,010	0,232 ± 0,016
R3	0,218 ± 0,025	0,217 ± 0,030	0,239 ± 0,021

karboxyterminální telopeptid kolagenu I (C-terminal telopeptide of collagen I, ICTP), který se uvolňuje z C-terminálního konce kolagenu při jeho degradaci. ICTP je pro svou malou molekulu (9–20kDa) vylučován ledvinami, tudíž jejich funkce ovlivňuje koncentraci ICTP v plazmě [15].

Novotvorba kosti byla hodnocena pomocí aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (N-terminal propeptide of procollagen I, PINP). PINP je ukazatelem časně novotvorby kostní tkáně, jeho molekula je bohatá na prolin tvořený z glutamátu [12] a hydroxyprolin [16]. Kolagen typu I vzniká v osteoblastech ve formě prokolagenu. Během syntézy kolagenu jsou z amino- a karboxy-terminálních částí prokolagenové molekuly odštěpeny pomocí specifických endoproteáz propeptidy a ty jsou následně uvolněny do krevního oběhu [17]. Koncentrace cirkulujícího PINP je tedy přímo úměrná množství nově vytvořeného kolagenu a množství následně mineralizované kostní matrix. Hojně se tento ukazatel využívá k monitorování účinnosti terapie u osteoporotických pacientů, především jejího osteoanabolického účinku. Ve studiích na potkanech se ukázal jako vhodný marker k posouzení kostní novotvorby [18,19].

Osteokalcin (OC) je nekolagenní protein syntetizovaný osteoblasty, osteocyty a odontoblasty s krátkým biologickým poločasem 4 minuty [20]. Syntéza OC je závislá na vitamínu K [21] a aktivní formě vitamínu D, kalcitriolu [22]. Osteoblasty syntetizují intaktní OC, který se váže na hydroxyapatit kostní matrix pomocí zbytků gamma-karboxyglutamových kyselin. Kromě intaktního OC lze v plazmě nalézt fragmenty OC vzniklé intracelulárními procesy nebo degradací v cirkulaci (C fragment, N-fragment, N-MID fragment a MID-fragment). Osteokalcin, který je považován za specifický marker pozdní diferenciace osteoblastů, je indukován až po expresi alkalické fosfatázy (ALP) a kolagenu I. Nicméně ve studii Ivaska et al. [23] byl osteokalcin považován nejen za marker kostní novotvorby, ale i resorpce. OC se totiž váže na hydroxyapatit kostní matrix, a může být tedy uvolňován do cirkulace nejen během syntézy kosti, ale také během odbourávání kosti.

Stav kostní tkáně byl dále hodnocen pomocí zobrazovací neinvazivní metody – denzitometrie, která měří hustotu kostní hmoty pomocí dvouenergie rentgenové absorpciometrie (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA). Výsledek je vyjádřen jako minerální hustota kosti (bone mineral density, BMD) s jednotkami g/cm². U lidí se kromě celotělové denzitometrie, měří BMD především v oblasti bederních obratlů, proximálního femuru (krček femuru) a distálním předloktí. Kostní minerální hustota je u potkanů nejčastěji měřena v oblasti femuru (diafýza nebo celý femur), bederních a ocasních obratlů, ale je možná i celotělová denzitometrie. K měření je používán speciální software pro malá zvířata, který je součástí DXA přístroje používaného v klinické praxi.

Užívání doplňků stravy k podpoře růstu svalové hmoty, ať již výše zmíněných nebo jiných, se v posledních letech stalo velmi populární mezi všemi věkovými kategoriemi a to převážně u mužů. V této studii vycházíme z předpokladu, že změny ve svalové hmotě by měly být provázeny změnami ve struktuře kostní tkáně. Pro zjištění účinku samotné diety byli v této studii použiti zdraví dospělí samci potkanů, u kterých není metabolismus kostí negativně ovlivněn ani nedo-

statkem anabolických hormonů, ani jiným patologickým stavem. Cílem této studie bylo zodpovědět otázku, zda HPD s kaseinem nebo dieta obohacená o glutamin bude pro kostní tkáň prospěšná či naopak škodlivá.

Materiál a metody

Dieta: Diety byly připraveny ze sypké standardní diety pro hlodavce (ST-1, VELAS, Lysá nad Labem). Kontrolní dieta byla bez obohacení (SLD), vysokoproteinové diety byly obohacené o kasein nebo o glutamin. V dietě SLD bylo 24 % dusíkatých látek, v dietě s kaseinem a glutaminem jejich podíl stoupl o 50 %, což odpovídá 36 % aminokyselin ve volné či vázané formě. Směs byla smíchána s malým množstvím vody, která byla obarvena potravinářskými barvami ke snadnějšímu rozpoznání jednotlivých diet. Pomocí mlýnku byly vytvořeny válečky, které byly sušeny v sušičce při teplotě 55 °C. Takto připravená dieta byla skladována na chladném a suchém místě.

Zvířata: Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LFUK v Hradci Králové. Samci potkanů kmene Wistar (Biotest s. r. o., Konárovice) byli rozděleni do 3 skupin po 6 zvířatech. První skupinu (KO) tvořila kontrolní zvířata, která byla krmena standardní laboratorní dietou (SLD), druhá skupina s vysokoproteinovou dietou (HPD) byla tvořena zvířaty krmenými SLD obohacenou o kasein (100 g SLD + 19,7 g kaseinu), zvířata ve třetí skupině (GLN) byla krmena SLD obohacenou o glutamin (100 g SLD + 16,6 g GLN). Zvířata byla chována za standardních podmínek (12 hodin/12 hodin světlo/tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost 30–70 %), živena dietami a pitnou vodou *ad libitum* po dobu 16 týdnů. Každý druhý den byla zvířata vážena a byla zaznamenávána spotřeba diety. Noc před usmrcením byla zvířatům odebrána dieta. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v celkové anestézii parami éteru ve funkční digestoři.

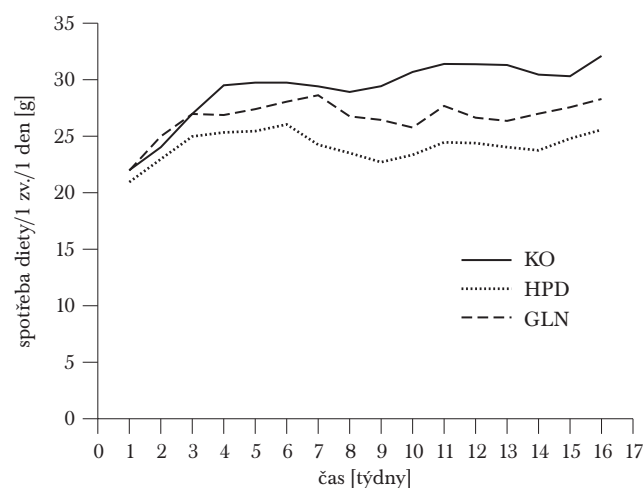
Odběr vzorku: Krev získaná z bifurkace břišní aorty byla centrifugována při 3 500 otáčkách/min. po dobu 10 minut k získání séra. Sérum bylo zamraženo na –70 °C až do doby analýzy. Po vyjmutí vnitřních orgánů byla zvířata zašita a následně byla změřena kostní minerální denzita. Poté byly zvířatům vyjmuty oba femury, obě tibie a část ocasních obratlů. Vyjmuté kosti byly zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a v plastovém sáčku zamraženy na –70 °C až do dalšího zpracování.

Osteologické vyšetření: Kostní minerální hustota byla změřena v Osteocentru Fakultní nemocnice v Hradci Králové pomocí dvouenergievé rentgenové absorpciometrie (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). Kostní minerální denzita (BMD, g/cm²) byla měřena ve třech částech těla potkana: oblast diafýzy stehenní kosti, oblast bederních a ocasních obratlů (obr. 1). Všechna měření byla provedena s použitím softwaru s vysokou rozlišovací schopností určeného pro měření malých zvířat.

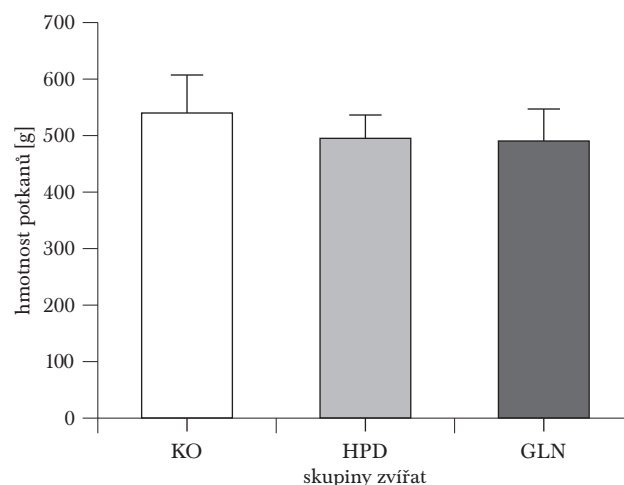
Biochemická analýza: V séru byly pomocí enzymoimunoanalytické metody (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) stanoveny základní markery kostního metabolismu. Kostní novotvorba byla hodnocena stanovením koncentrace osteokalcinu (OC, µg/l, Immunodiagnostic Systems Ltd, Velká Británie) a aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP, µg/l, Immunodiagnostic

Systems Ltd, Velká Británie). Kostní resorpce byla hodnocena pomocí karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I (ICTP, µg/l, Immunodiagnostic Systems Ltd, Velká Británie). Metoda ELISA, která byla použita pro stanovení kostních markerů, je kompetitivní enzymoimunoanalýza, ve které soutěží antigen přítomný v analyzovaném vzorku s antigenem značeným enzymem o vazebná místa na specifické protilátce. Intenzita vzniklého zabarvení je nepřímě úměrná koncentraci markeru ve vzorku. Mez detekce pro ICTP je 2 µg/l a 50 µg/l pro OC. Pro PINP není mez detekce výrobcem uvedena.

Graf 1
Spotřeba diety v průběhu pokusu přepočítaná na 1 zvíře na 1 den (g)
KO – kontrolní skupina, HPD – skupina s vysokoproteinovou dietou, GLN – skupina s dietou se zvýšeným obsahem glutaminu



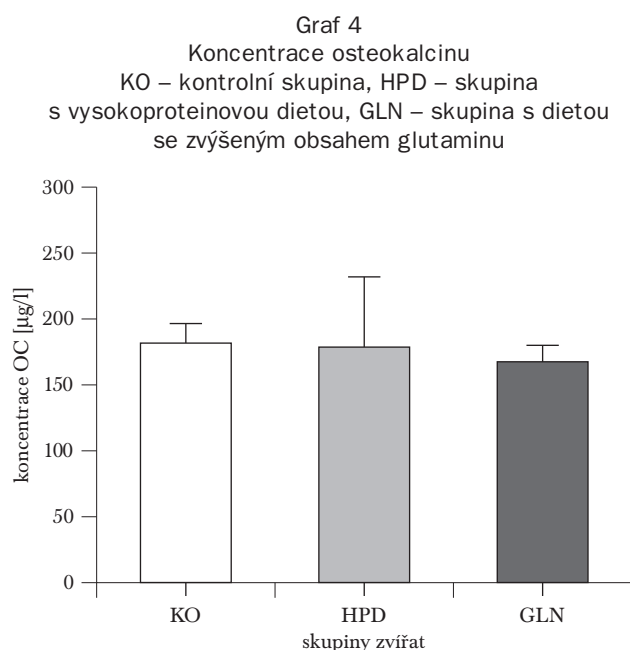
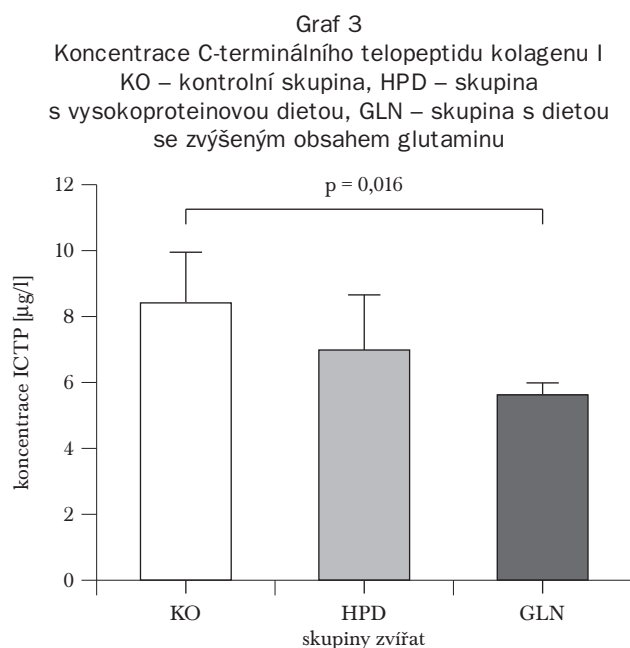
Graf 2
Tělesná hmotnost potkanů
KO – kontrolní skupina, HPD – skupina s vysokoproteinovou dietou, GLN – skupina s dietou se zvýšeným obsahem glutaminu



Statistická analýza: Statistická analýza byla provedena použitím softwaru SigmaStat 3.1 Jandel Scientific® (San Rafael, CA, USA). Významnost jednotlivých diet byla hodnocena One-Way ANOVA testem. Data byla prezentována jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka (SD). Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou $p < 0,05$.

Výsledky

Výsledky všech měření mají Gaussovo rozdělení pravděpodobnosti, a jsou tedy uváděny jako průměr a směrodatná odchylka.



Spotřeba diety byla u obou experimentálních skupin zvířat s vysokoproteinovou dietou nižší než u skupiny kontrolní (*graf 1*).

Nárůst tělesné hmotnosti u skupiny GLN i HPD byl nižší ve srovnání s nárůstem hmotnosti kontrolní skupiny. Skupina GLN ($489,5 \pm 57,2$ g) měla o 9 % nižší nárůst tělesné hmotnosti a skupina HPD ($495,5 \pm 41,3$ g) o 8 % vs. KO ($538,8 \pm 68,3$ g, $p = 0,288$), rozdíly ale nebyly statisticky významné (*graf 2*).

Koncentrace ukazatele kostní resorpce ICTP byla statisticky významně snížena u skupiny GLN ($5,62 \pm 0,37$ µg/l, $p = 0,016$), a to o 33 % vs. KO ($8,42 \pm 1,53$ µg/l). Došlo i ke statisticky nevýznamnému poklesu u skupiny HPD ($6,97 \pm 1,69$ µg/l, $p = 0,220$) o 17 % vs. KO (*graf 3*).

Koncentrace ukazatele kostní novotvorby OC byla snížena u skupiny GLN ($167,39 \pm 12,73$ µg/l) o 8 % vs. KO ($181,80 \pm 15,10$ µg/l, $p = 0,735$), ale bez statistické významnosti. U skupiny HPD ($178,58 \pm 53,61$ µg/l) byly hodnoty shodné s kontrolou (*graf 4*).

U druhého ukazatele kostní novotvorby, PINP, došlo ke statisticky nevýznamnému poklesu koncentrace jak u skupiny GLN ($22,77 \pm 6,09$ µg/l) o 7 %, tak u skupiny HPD ($22,28 \pm 4,09$ µg/l) o 9 % vs. KO ($24,57 \pm 6,86$ µg/l, $p = 0,807$) (*graf 5*).

K poklesu BMD došlo v oblasti ocasních obratlů u skupiny GLN ($0,232 \pm 0,016$ g/cm²) o 5 % a u skupiny HPD ($0,230 \pm 0,01$ g/cm²) o 6 % vs. KO ($0,245 \pm 0,022$ g/cm², $p = 0,265$), rozdíly ale nebyly statisticky významné.

Naopak k nárůstu BMD došlo v oblasti diafýzy stehenní kosti u skupiny GLN ($0,239 \pm 0,021$ g/cm²) o 10 % ve srovnání s kontrolou ($0,218 \pm 0,025$ g/cm², $p = 0,294$), ale nárůst nebyl statisticky významný. Skupina HPD ($0,217 \pm 0,030$ g/cm²) měla výsledky shodné s kontrolou.

BMD v oblasti bederních obratlů byla téměř shodná u všech tří skupin (*tabulka 1*).

Diskuze

Glutamin se využívá nejen jako výživový doplněk sportovců (atletů, kulturistů) [1,2], ale také k léčbě proteokatabolických stavů (popáleniny, sepse, krvácení) [24]. Za fyziologických podmínek je hlavním místem využití glutaminu gastrointestinální trakt, ledviny, játra a v malé míře také imunitní systém. Při onemocněních s katabolickým stavem dochází k aktivaci proteolýzy a oxidaci aminokyselin s rozvětveným řetězcem (branched-chain amino acid, BCAA) v kosterním svalstvu a ke zvýšené utilizaci glutaminu ve viscerálních tkáních. Následkem je pokles hladiny glutaminu v plazmě [25]. Přestože jsou BCAA zdrojem dusíku pro syntézu alaninu a glutaminu v kosterním svalstvu, jejich koncentrace neklesají, neboť se aktivuje jejich resyntéza z ketoanalog v játrech [26]. Konečným důsledkem proteokatabolického stavu je deficit glutaminu, který vede k rozvoji negativní dusíkové bilance a k oslabení imunitní odpovědi [27], neboť hlavním místem katabolismu glutaminu se stávají lymfocyty a monocyty imunitního systému, kde slouží jako zdroj pro syntézu nukleových kyselin, proteinů a ATP [26]. Proto tedy glutamin podávaný v dietě zvyšuje počet a aktivitu buněk imunitního systému [3]. Stimulované makrofágy mají zvýšenou sekreci arginázy, čímž se zvýší poptávka po glutaminu, jakožto prekurzo-

ru pro arginin [28] a dále mají zvýšenou spotřebu redukovaného nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), jehož zdrojem je také glutamin [3]. Z výsledků Rogero et al. [29] dále vyplývá, že glutamin je aminokyselina esenciální v procesu dělení buněk a hraje významnou roli v hematopoetické tkáni.

Z našich výsledků je patrný statisticky nevýznamný rozdíl v nárůstu hmotnosti u skupiny kontrolní ve srovnání se skupinami s dietou obohacenou o proteiny (HPD a GLN), kde byl nárůst tělesné hmotnosti nižší. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben sníženým příjmem potravy u skupiny HPD a GLN vs. KO, což je zřejmé z grafu 1.

Ve studii Obeid et al. [30] byla potkanům Sprague-Dawley po dobu jednoho týdne podávána dieta obohacená o glutamin (40 g glutaminu/1 kg diety). Bylo zjištěno, že glutamin stimuluje syntézu glykogenu v játrech, ale byl pozorován pouze statisticky nevýznamný pokles v příjmu potravy ve srovnání s kontrolou. Autoři se tedy domnívají, že glutamin nemá vliv na příjem potravy, protože nestimuluje syntézu glykogenu cestou přes pyruvát, která je energeticky neúčinná, což by následně vedlo k nižšímu nárůstu tělesné hmotnosti u zvířat.

Rozdíl ve výsledcích ve studii Obeid et al. [30] a v naší studii by mohl být vysvětlen použitím jiného kmene potkanů (Sprague-Dawley vs. Wistar) a také kratší dobou trvání studie (1 týden vs. 16 týdnů).

Existuje velmi málo prací, které se věnují vztahu glutaminu a metabolismu kostní tkáně.

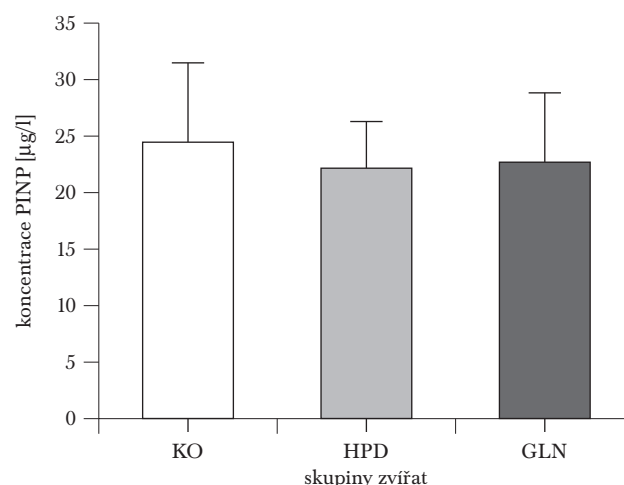
Existují ale práce, které se zabývají vztahem alfa ketoglutarátu (AKG) a kostí, kdy je známo, že AKG je prekurzorem pro syntézu glutamátu a glutaminu.

V naší studii došlo k statisticky nevýznamnému zvýšení BMD v oblasti diafýzy femuru (tvořena převážně kostí kortikální) a k mírnému snížení v oblasti ocasních obratlů (tvořených převážně kostí trabekulární) u skupiny GLN ve srovnání s KO a HPD. Výsledky měření BMD by mohly být pravděpodobně ovlivněny nižším nárůstem tělesné hmotnosti u HPD a GLN skupiny vs. KO, ale vzhledem k tomu, že rozdíly v nárůstu hmotnosti mezi skupinami nejsou statisticky významné, tak na ně neklademe větší důraz. Ve shodě s našimi výsledky došlo k nárůstu kostní minerální hustoty v oblasti kortikální i trabekulární kosti tibie a femuru i jejich mechanických vlastností po dlouhodobém podávání diety obohacené o AKG ve studiích jak na krocanech [7], tak na prasnicích [8]. Tento pozitivní efekt AKG byl prokázán nejen na kortikální kosti žeber u neonatálních samců jehňat [9], ale i na denervované tibii (model experimentální osteopenie) kroců [10]. V této práci bylo prokázáno, že podávání AKG vede ke zvýšení koncentrace prolinu, který hraje klíčovou roli v tvorbě kolagenu [16], ale naopak k poklesu koncentrace glutaminu [10].

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 diferenciálních markerů Cbfa1 a proteinů kostní matrix. Můžeme se domnívat, že pozitivní vliv glutaminu v dietě byl zprostředkován jeho deaminací na glutamát, který ovlivňuje anaboličké změny v kostních buňkách pomocí glutamátergní inervace [8].

Podobné výsledky byly prezentovány i u lidí. Schürch

Graf 5
Koncentrace N-terminálního propeptidu prokolagenu I
KO – kontrolní skupina, HPD – skupina s vysokoproteinovou dietou, GLN – skupina s dietou se zvýšeným obsahem glutaminu



et al. [11] ve své práci sledoval vliv suplementace mléčnými proteiny na kostní hmotu u pacientů s frakturou krčku kosti stehenní. Suplementovaní pacienti měli vyšší hladiny insulinu podobného růstového faktoru-I (IGF-I), sníženou kostní ztrátu v oblasti proximálního femuru a kratší dobu hospitalizace. Naopak u potkanů 8 týdnů živených nízkoproteinovou dietou poklesla kostní minerální hustota nejvíce v trabekulární kosti (bederní páteř, proximální a distální femur), v kortikální kosti až po 16 týdnech. Změny v BMD vedly také k poklesu pevnosti kosti [31]. Tento efekt pravděpodobně souvisí s poklesem hladiny IGF-I, což potvrzuje Bourrin et al. [32], který zjistil jak pokles IGF-I, tak i pokles osteokalcinu.

I v našem experimentu byly koncentrace ukazatele kostní novotvorby, osteokalcinu, mírně snížené u skupiny GLN ve srovnání s kontrolami i se skupinou HPD, rozdíly ale nebyly statisticky významné.

Závěr

U skupiny s dietou obohacenou o glutamin došlo ve srovnání s kontrolní skupinou k významnému poklesu koncentrace markeru kostní resorpce, ICTP, v séru a k mírnému poklesu koncentrace markerů kostní novotvorby, PINP a osteokalcinu. S tímto poklesem by mohl pravděpodobně souviset mírný pokles BMD v oblasti ocasních obratlů, kde se nachází metabolicky aktivnější trámčitá kost. Změny v koncentracích kostních markerů a BMD u skupiny s vysokoproteinovou dietou ve srovnání s kontrolou měly podobný směr jako u skupiny s dietou obohacenou o glutamin. Proč se překvapivě neobjevily změny v oblasti bederních obratlů, kde převládá trámčitá kost, a proč došlo k nárůstu BMD v oblasti diafýzy femuru s převahou kortikální kosti u skupiny GLN, zůstává nejasné. K určení vzájemných vztahů mezi vysokoproteinovou dietou nebo dietou obohacenou o glutamin a metabolismem kostí u potkanů je nutný další výzkum.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a MSM 0021620820.

Použité zkratky

AKG	alfa-ketoglutarat
ALP	alkalická fosfatáza
ATP	adenosintrifosfát
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
BMD	minerální hustota kostí
DXA	dvouenergiová rentgenová absorpciometrie
FN	Fakultní nemocnice
GLN	glutamin
HPD	vysokoproteinová dieta
ICTP	karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
IGF-I	inzulinu podobný růstový faktor I
KO	kontrolní skupina zvířat
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
NADP+	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OC	osteokalcin
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I
RIL a VIV	Radioizotopové laboratoře a Vivárium
SLD	standardní laboratorní dieta
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky

Literatura:

- Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, Kobayashiand H, Mawatari K. Nutritional Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *J Nutr* 2006;136(2):529–530.
- Gleeson M. Interrelationship between Physical Activity and Branched-Chain Amino Acids. *J Nutr* 2005;135(6):1591–1595.
- Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 2001;131:2515–22.
- Ziegler TR. Glutamine supplementation in bone marrow transplantation. *Br J Nutr* 2002;87, Suppl. 1:9–15.
- Mora LO, Antunes LMG, Francescato HDC, Bianco MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 2002;518:65–70.
- Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *Br J Nutr* 2000;8, Suppl 1:147–153.
- Tatara MR, Pierzynowski SG, Majcher P, Krupski W, Brodzki A, Studzinski T. Effect of alphaketoglutarate (AKG) on mineralisation, morphology and mechanical endurance of femur and tibia in turkey. *Bull Vet Ins Pulawy*. 2004;48:305–309.
- Andersen NK, Tatara MR, Krupski W, Majcher P, Harrison AP. The long effect of -ketoglutarate, given early in postnatal life, on bone growth and various bone parameters in pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2008;92: 519–528.
- Tatara MR, Tygesen MP, Sawa-Wojtanowicz B, Krupski W, Majcher P, Harrison AP. Bone development: the effect of short-term alpha-ketoglutarate administration on long-term mechanical properties of ribs in ram lambs. *Small Rum Res* 2007;67:179–183.
- Tatara MR, Brodzki A, Krupski W, Śliwa E, Silmanowicz P, Majcher P, Pierzynowski SG, Studziński T. Effect of Ketoglutarate on Bone Homeostasis and Plasma Amino Acids in Turkeys. *Poult Sci* 2005; 84(10):1604–1609.
- Schürch MA, Rizzoli R, Slosman D, Vadas L, Vergnaud P, Bonjour JP. 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. *Ann Intern Med* 1998;128:801–809.
- Holeček M. Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin. 1. vydání. Praha, Grada Publishing, a. s., 2006:286.
- Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974;249:5070–5079.
- Cao Y, Feng Z, Hoos A, Klimberg VS. Glutamine enhances gut glutathione production. *J Parenter Enteral Nutr* 1998;22:224–227.
- Herrmann M, Seidel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;393(2):57–75.
- Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26(4):97–122.
- Merry AH, Harwood R, Wooley DE, Grant ME, Jackson DS. Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxy-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:83–90.
- Hale LV, Galvin RJ, Risteli J, Ma YL, Harvey AK, Yang X, Cain RL, Zeng Q, Frolik CA, Sato M, Schmidt AL, Geiser AG. PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone* 2007;40:1103–1109.
- Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Morko J, Rasi S, Risteli J, Halleen JM. Short-Term Changes in Serum PINP Predict Long-Term Changes in Trabecular Bone in the Rat Ovariectomy Model. *HYPERLINK "javascript:AL_get(this, 'jour', 'Calcif Tissue Int');"* *Calcif Tissue Int* 2008;82(2):155–161.
- Farrugia W, Melick RA. Metabolism of osteocalcin. *Calc Tissue Internat* 1986; 39:134–138.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(10):3925–3929.
- Yoon KG, Rutledge G, Buenaga RF, Rodan GA. Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* 1988;27(23):8521–8526.
- Ivaska KK, Hentunen TA, Vääräniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Väänänen KK. Release of Intact and Fragmented Osteocalcin Molecules from Bone Matrix during Bone Resorption in Vitro. *J Biol Chem* 2004;279(18):18361–18369.
- Newsholme E, Hardy G. Supplementation of Diets with Nutritional Pharmaceuticals. *Nutrition* 1997;13(9):837–839.
- Holeček M, Muthny T, Kovarik M, Sispara 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. *J Parenter Enteral Nutr* 2006;30(6):467–473.
- Holeček M. Glutamin a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem-praktický význam jejich metabolických vztahů. *Časopis lékařů českých*. 2005;14: Supplementum 3:9–12.
- Bistran, BR. Dietary treatment in secondary wasting and cachexia. *J Nutr* 1999; 129:290–294.
- Murphy C, Newsholme P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin Sci* 1998;95:397–407.
- Rogero MM, Tirapegui J, Vinolo MA, Borges MC, de Castro IA, Pires IS, Borelli P. Dietary Glutamine Supplementation Increases the Activity of Peritoneal Macrophages and Hemopoiesis in Early-Weaned Mice Inoculated with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *J Nutr* 2008;138(7):1343–1348.
- Obeid OA, Bittar ST, Hwalla N, Emery PW. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. *Nutrition* 2005;21(2):224–229.
- Ammann P, Bourrin S, Bonjour JP, Meyer JM, Rizzoli R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 2000;15(4):683–690.
- Bourrin S, Ammann P, Bonjour JP, 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. *Endo*. 2000;141(9):3149–3155.