

Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar

P. ŽIVNÝ¹, H. ŽIVNÁ², I. GRADOŠOVÁ², K. ŠVEJKOVSKÁ³, S. HUBENÁ¹, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Hradec Králové,

²Radioizotopové laboratoře a vivárium, Karlova Univerzita Praha, Lékařská fakulta v Hradci Králové,

³CCBR Czech, a. s., Pardubice

SOUHRN

Živný P., Živná H., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Palička V.: **Vliv dyslipidemických diet na kostní metabolismus u samců potkanů kmene Wistar**

Cíl studie: Cílem studie bylo sledovat u potkanů vliv diet navozujících jaterní poškození a steatózu na kostní tkáň. Dali jsme si otázku, zda diety, které ovlivňují metabolismus tuků, též ovlivňují metabolismus kostí a jejich pevnost.

Metodika: Pokusy byly provedeny na dospělých potkanech – samcích kmene Wistar rozdělených do 4 skupin, živěných dietami *ad libitum*: standardní laboratorní dietou (SD), dietou se 4 % cholesterolu (CHOL), dietou methionin-cholin deficitní (MCDD) a dietou s 1 % kyseliny orotové (OA). Potkani byli po 28 dnech usmrceni vykrvácením v celkové anestezii. Následně byla stanovena kostní minerální denzita (BMD) pomocí dual energy X-ray absorptiometry (DXA, Hologic, Waltham, MA USA), femury byly vyjmuty a provedeno biomechanické testování jejich odolnosti. V homogenátech kostní tkáně byly stanoveny osteokalcin, prokolagen I N-terminální propeptid (PINP) a carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) metodou EIA (pg/ml). V séru byly stanoveny analyty: glukóza (mmol/l), inzulin (μg/ml) a leptin (pg/ml). Statistika byla provedena software "SigmaStat 3.1" Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM ($p < 0,05$) nebo medián (percentil 25%–75%).

Výsledky: Všechny měřené oblasti pomocí DEXA byly nesignifikantně vyšší u skupiny MCDD ve srovnání s ostatními skupinami. Celková kostní denzita (medián) byla vyšší u MCDD (0,160 g/cm²) ve srovnání s ostatními skupinami SD (0,147), CHOL (0,150) a OA (0,149). Síla nutná ke zlomení diafýzy femuru byla u skupin (149 ± 7 N), CHOL group (157 ± 5) a MCDD (148 ± 6) oproti skupině OA (182 ± 2). Síla nutná k fraktuře krčku femuru byla nižší u skupiny SD (129 ± 8 N), CHOL (123 ± 5 N), MCDD (106 ± 5) oproti skupině OA (179 ± 10). Koncentrace osteokalcinu byla u skupiny SD (2,07 ± 0,07), CHOL (2,46 ± 0,09), MCDD (2,11 ± 0,20) a OA (2,56 ± 0,07). Koncentrace PINP byla u skupiny SD (43,8 ± 4,8), CHOL (48,1 ± 4,1), MCDD (48,4 ± 6,8) avšak u OA (36,5 ± 4,4). U CTX nebyly zaznamenány rozdíly mezi skupinami: SD (0,91 ± 0,09), CHOL (0,84 ± 0,05), MCDD (0,91 ± 0,20) a OA (0,91 ± 0,07). Nižší koncentrace leptinu byla u skupiny CHOL (4,84) a OA (5,08) ve srovnání s SD (8,71). Vyšší glykémie byla u skupin CHOL (8,15 ± 0,28) a OA (8,25 ± 0,47) než u SD (5,94 ± 0,21).

Závěry: Naše nálezy naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou vedla u potkanů ke snížení tvorby kolagenu kostní tkáně, nedošlo ke zvýšení BMD ve srovnání s SD, ale došlo ke zvýšení odolnosti kosti při biomechanickém testování. Dieta MCDD naopak vedla k nesignifikantnímu zvýšení BMD, mírnému zvýšení tvorby kolagenu, ale nevedla ke zvýšení odolnosti kosti.

Klíčová slova: cholesterol, játra, potkan, orotová kyselina, methionin, cholin, kost

SUMMARY

Živný P., Živná H., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Palička V.: **Effect of dyslipidaemic diets on bone status in male Wistar rats**

Aim: The influence of dyslipidaemic diets on liver impairment and bone metabolism and bone rigidity was studied. The question was whether liver impairment is a key moment for bone changes or whether bone changes develop independently.

Methods: Male Wistar rats were divided into the following 4 groups (6 rats in each group, 366–440 g): SLD (standard laboratory diet), CHOL (SLD enriched with 4% of cholesterol), MCDD (diet without choline and methionine) and OA (SLD enriched with 1% of orotic acid). The rats were sacrificed by exsanguination after 28 days. Then *post mortem* bone mineral density (BMD) was measured using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA, Hologic, Waltham, MA, USA). The femurs were extracted from animals and broken in a controlled manner using biomechanical testing. Bone homogenate was analyzed for osteocalcin, procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) and carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) by EIA (pg/mL). Serum glucose (mmol/L), insulin (μg/mL) and leptin (pg/mL) were measured. Statistical analyses were performed using the SigmaStat 3.1 software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). The data were expressed as mean ± SEM ($p < 0.05$) or median (percentile 25%–75%).

Results: All DEXA parameters were insignificantly higher in the MCDD group than in the other groups. Total BMD (median) was higher in MCDD (0.160) vs. SD (0.147), CHOL (0.150) and OA (0.149). The force to break the femur (N) was in SD (149 ± 7), CHOL (157 ± 5) and MCDD (148 ± 6) vs. OA (182 ± 2). The force to break the femoral neck was in SD (129 ± 8), CHOL (123 ± 5) and MCDD (106 ± 5) vs. OA (179 ± 10). Lower concentration of osteocalcin was in SD (2.07 ± 0.07) vs. CHOL (2.46 ± 0.09), MCDD (2.11 ± 0.20) and OA (2.56 ± 0.07). Higher PINP levels were in SD (43.8 ± 4.8), CHOL (48.1 ± 4.1) and MCDD (48.4 ± 6.8) vs. OA (36.5 ± 4.4). CTX was without differences between the groups: SD (0.91 ± 0.09), CHOL (0.84 ± 0.05), MCDD (0.91 ± 0.20) and OA (0.91 ± 0.07). Lower leptin concentration was in CHOL (4.84) and OA (5.08) vs. SD (8.71). Higher glucose concentration was in CHOL (8.15 ± 0.28) and OA (8.25 ± 0.47) vs. SD (5.94 ± 0.21).

Conclusions: The findings suggest that diet with orotic acid decreased bone collagen formation, did not influence BMD but increased bone rigidity. The other diet without choline and methionine (arginine compensation) leads to higher BMD and PINP, but without improvement of bone rigidity (fracture resistance).

Keywords: cholesterol, liver, rat, orotic acid, methionine, choline, bone

Osteologický bulletin 2011;16(4):148–152

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

Došlo do redakce: 31. 10. 2011

Přijato k tisku: 4. 1. 2012

Úvod

V klinické praxi je vztah mezi poruchou funkce jater a ovlivněním kvality kosti nebo zvýšením rizika fraktur zcela jednoznačný. Významnější jaterní patologie a často také způsob její terapie (kortikoidy) jsou spojeny se změnami v intermediárním metabolismu, které se dotýkají stavu skeletu a vedou ke zvýšení rizika fraktur. Existují však i specifické vazby mezi jaterní a kostní patologií. Jaterní X receptory (LXR, α , β) jsou na jedné straně důležitým regulátorem metabolismu cholesterolu a modulátory zánětlivých signálů, současně však hrají roli v regulaci kostního metabolického obrátu, jsou inhibitory RANKL zprostředkované diferenciace osteoklastů [1]. Cholin-methionin deficitní dieta vede k alteraci kostní tkáně a také ke vzniku jaterní steatózy [2]. Položili jsme si otázku, zda diety, které ovlivňují metabolismus tuků a vedou ke vzniku jaterní steatózy, též paralelně (tedy nikoliv cestou poškození jater) ovlivňují metabolismus kostí a jejich pevnost. Není pochyb, že navození poruchy funkce jater (hepatodystrofie, fatty liver disease) má vliv na metabolismus kosti (kostních buněk, skeletu) [1,3], nelze však zcela vyloučit i přímý vliv diety na kost bez účasti jater. V poslední době se objevují práce, zvažující u různých nox (i dietního původu) orgány zprostředkovaný (při poškození jater nebo ledvin) efekt, nebo přímý efekt na funkci osteoklastů a osteoblastů, a tím na funkci a kvalitu kostní tkáně [4].

Materiál a metody

Diety byly připraveny podle dostupné literatury (www.test-diet.com, www.dyets.com) z kaseinu (PML Inc., Nový Bydžov), kukuřičného škrobu (Škrobárny Pelhřimov), celulózy (Phrikolat, Chemische Erzeugnisse GmbH, Germany), chloridu cholinu, L-cysteinu, L-argininu a sacharózy (Fisher Scientific, Ltd., Pardubice), kukuřičného oleje (CANO Ltd. Heřmanův Městec), DL-methioninu (Sigma-Aldrich, Ltd. Praha), vitamínového a minerálního mixu – AIN-93M Maintenance Purified Diet 5801-M, TestDiet. Tyto základní substance diet tvořily základ kontrolní diety, standardní laboratorní diety (SD). V této dietě bylo 9 % cholinu, 12 % methioninu a 4 % argininu. První experimentální dieta byla obohacena o 4 % cholesterolu (CHOL). Druhá dieta byla připravena bez přídavku methioninu a cholinu (MCDD), nedostatek aminokyselin jsme nahradili 7 % L-argininu. Třetí dieta (OA) vznikla ze základní diety obohacením o 1 % kyseliny orotové. Z těchto směsí byly připraveny pelety a usušeny v sušičce potravin při 55 °C.

Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK HK). Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové (č.j. 8593/2008-30). Byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR) a byli rozděleni do čtyř skupin po 6 zvířatech s tělesnou hmotností 262 ± 6 g na začátku a 414 ± 16 g na konci pokusu. Potkani byli umístěni v plastových klecích a chováni za standardních podmínek. Byli krmeni připravenými dietami a pitnou vodou *ad libitum*.

Skupina SD: živena standardní laboratorní dietou; **skupina CHOL:** standardní laboratorní dieta byla obohacena o 4 % cholesterolu; **skupina MCDD:** standardní laboratorní dieta bez cholinu ani methioninu, obohacena o arginin; **skupina OA:** standardní laboratorní dieta byla obohacena o 1 % kyseliny orotové. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové anestezii za 28 dní.

Poté *post mortem* byla změřena denzita kostního minerálu – bone mineral density (BMD; g/cm²) dvouenergií absorpční spektrofotometrií v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. BMD v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného programu (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA).

Následně byly vyňaty z potkanů ocasní obratle a pravé femury. S využitím homogenizačního přístroje MagNA Lyser instrument (Roche Applied Science, Německo) jsme homogenizovali části ocasních obratlů (150 mg tkáně/1,5 ml fosfatového pufru). V získaném kostním homogenátu jsme stanovili koncentrace markerů kostního obrátu – osteokalcin (OC), prokolagen 1 N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA (µg/l; Uscnlife Sciences & Technology Co., Ltd., Čína).

V séru byly stanoveny koncentrace leptinu (pg/ml), glukózy (mmol/l) a inzulinu (µg/ml).

Tabulka 1
Sérové koncentrace glukózy (mmol/l), inzulinu (µg/ml) a leptinu (pg/ml)

	Glukóza mmol/l	Inzulin (µg/ml)	Leptin (pg/ml)
SD	5,94 ± 0,21	1,94 ± 0,24	8,71 (6,61–10,03)
CHOL	8,15 ± 0,28	1,50 ± 0,20	4,84 (3,86–6,57)
MCDD	7,01 ± 0,70	2,01 ± 0,31	8,44 (5,53–10,58)
OA	8,25 ± 0,47	2,41 ± 0,22	5,08 (4,23–5,86)
	SD vs CHOL p < 0,01	NS	SD vs CHOL p < 0,058
	SD vs OA p < 0,01		SD vs. OA p < 0,007

Pravé femury byly kontrolovaně zlomeny v testovacím přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové). Před testováním jsme změřili délku femuru a průměr v jeho střední části pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie). Femury byly lámány ve středu diafýzy pomocí tříbodového testování [5,6].

Statistická analýza byla provedena s využitím software "SigmaStat 3.1" Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Metodami One Way Anova, Holm-Sidak Metod. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ střední chyba ($p < 0,05$) nebo jako medián (a percentily 25%–75%).

Výsledky

Statisticky významné zvýšení glykémie a současně snížení leptinémie bylo zjištěno u skupiny CHOL a OA, tedy po 28 dnech příjmu diety obohacené o cholesterol nebo o kyselinu orotovou ve srovnání se skupinou kontrolní. V koncentracích inzulínu v séru nebyly mezi skupinami statisticky významné rozdíly (tab. 1).

Všechny sledované parametry denzity kostního minerálu

byly statisticky nevýznamně vyšší u skupiny MCDD než u ostatních skupin (tab. 2).

Nižší koncentrace osteokalcinu v kostním homogenátu byly u skupiny SD než u skupin CHOL, MCDD a OA. Vyšší hodnoty PINP byly u skupin CHOL a MCDD ve srovnání se skupinami SD a OA. Koncentrace CTX byly bez významných rozdílů mezi všemi skupinami (tab. 3).

Síla nutná k tříbodovému zlomení femuru (N) byla nižší u skupiny SD, CHOL a MCDD než u skupiny OA. Síla nutná ke zlomení krčku femuru byla nižší u skupiny CHOL a MCDD než u skupiny SD a OA (graf 1).

Mezi skupinami jsme nenalezli žádné statisticky významné rozdíly v délkách femurů a tloušťkách (šířkách) střední části femuru (tab. 4).

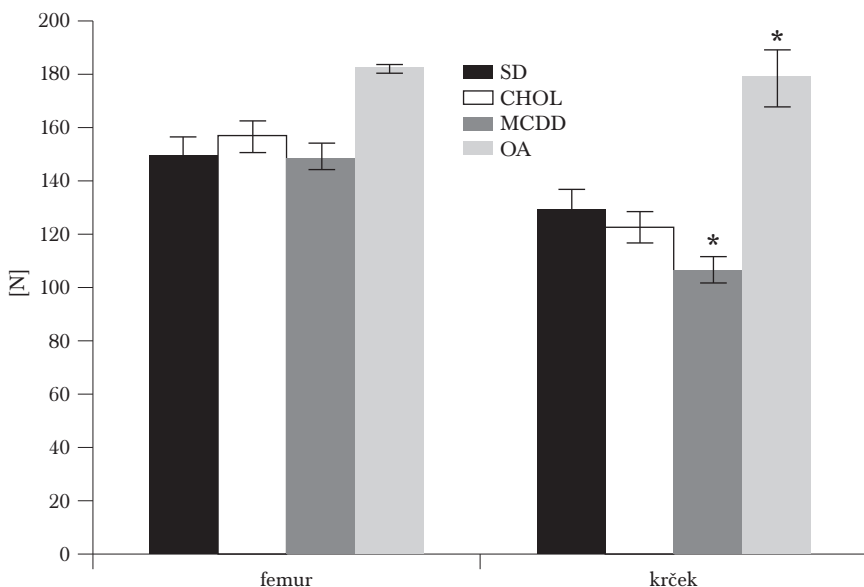
Diskuze

Použité diety vedou ke vzniku jaterní steatózy různými způsoby. Dieta obohacená o cholesterol vede k jaterní steatóze komplexním způsobem, který zahrnuje odlišné regulace některými zásadními mediátory, zejména leptinem. Deficit cholinu a methioninu způsobuje poškození buněč-

ných membrán jaterních buněk, zejména hepatocytů a jejich organel, jejichž je cholin součástí, dochází ke změnám fosfolipidů zejména v membránách endoplazmatického retikula a celý proces vede k ukládání neutrálních tuků v játrech [7,8]. Dieta se zvýšeným obsahem kyseliny orotové (tj. uracil-6-karboxylová kyselina, dříve označována vitamín B13) rovněž ovlivňuje jaterní metabolismus. Kyselina orotová inhibuje export nově syntetizovaných jaterních lipoproteinů z jater [9], což je velmi závažné, protože játra jsou hlavním zdrojem lipoproteinů obsahujících cholesterol. Dieta s kyselinou orotovou významně zvyšuje aktivitu „rate limiting“ enzymu pro syntézu triglyceridů a současně brání transportu lipoproteinů Golgiho aparátem [10], a tím způsobuje infiltraci jater triacylglyceroly a volnými mastnými kyselinami. Kyselina orotová také zvyšuje koncentraci superoxidového aniontu v játrech a snižuje aktivitu superoxididmutázy [11].

Zůstává otázkou, zda užitím těchto diet, navozujících jaterní poškození, případně steatózu, dochází primárně k poškození jater a následně ke změnám vlastností kostní tkáně, nebo zda tyto změny probíhají paralelně. Doba, po kterou byly diety podávány do usmrcení potkanů a testování vlastností kostí (28 dní), se v našem experimentu zdá být krátká na vývoj patofyziologických změn sériově. Spíše se jeví pravděpodobným paralelní průběh změn v játrech společně se změnami v kostech.

Graf 1
Síly nutné ke zlomení diafýzy femuru a krčku (N)



Tabulka 2
Denzita kostního minerálu u potkanů (g/cm²)

	Celková	Bederní páteř	Ocasní páteř	Pravý femur
SD	0,147 0,144–0,154	0,206 0,199–0,213	0,184 0,177–0,185	0,160 ± 0,004
CHOL	0,150 0,112–0,157	0,200 0,197–0,208	0,195 0,179–0,214	0,164 ± 0,003
MCDD	0,160 0,154–0,163	0,226 0,213–0,231	0,193 0,187–0,199	0,172 ± 0,008
OA	0,149 0,143–0,150	0,202 0,197–0,208	0,185 0,181–0,187	0,162 ± 0,006
	P = 0,085	P = 0,176	P = 0,158	P = 0,603

Paradoxně minimálně se na vlastnostech kostního metabolismického obratu a na pevnosti studovaných kostí projevovala dieta s vyšším obsahem cholesterolu. Změny v metabolismu tuků jsou přitom často diskutovaným tématem ve vztahu k metabolismu kostní tkáně. Jaterní X receptor (LXR, α, β), regulátor metabolismu cholesterolu a zánětlivých signálů, je důležitým inhibítozem RANKL-zprostředkované diferenciaci osteoklastů [1]. V humánních multicentrických studiích byly sledovány vztahy metabolismu cholesterolu a kvality kostní tkáně. Pokud u lidí klesaly koncentrace celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, a naopak stoupaly koncentrace HDL-cholesterolu, pak stoupaly také koncentrace kostní alkalické fosfatázy a NTX [12]. Studie na myších ukazují, že HDL může „nepřímou“ ovlivňovat osteoblasty a osteoklasty, ale nejsou údaje o zpětné vazbě kostí směrem k regulaci hladin HDL cholesterolu [13].

Cholin deficitní nebo methionin cholin deficitní diety vedou k rozvoji jaterní steatózy výše popsáním způsobem. Gorustovich a spolupracovníci testovali laminární titanové implantáty v tibiích potkanů při podávání standardní a cholin deficitní diety po dobu 15 a 30 dnů. K rozvoji jaterní steatózy došlo již po 15 dnech podávání cholin deficitní diety. Periimplantační osteogeneze hodnocená histomorfometricky byla nižší o 28 % (15 dní) a 75 % (30 dní podávání diety). Autoři se přiklánějí k závěru, že osteogeneze byla ovlivněna jaterní alterací [3].

Jiní autoři sledovali vliv cholin-methionin deficitní diety na kortikální kost u potkanů. U potkanů živěných touto dietou došlo po měsíci k poklesu objemu především kortikální kosti, zejména v souvislosti se zvýšením trabekulární, endokortikální kostní formace, kde hlavní roli hrála redistribuce minerálů v kortikální kosti. Též se vyvíjí jaterní steatóza. Je možné, že tyto procesy probíhají paralelně. V našem experimentu podávaná dieta bez cholinu a methioninu vedla k nálezům vyšší BMD a hodnot PINP, ale nedošlo ke zvýšení pevnosti kostí. Tyto kosti se jeví jako křehčí. Jaterní steatóza se ve sledovaném intervalu nevyvinula, nejspíše vlivem přidaného argininu [14].

Kyselina orotová způsobuje v toxických dávkách jaterní steatózu až hlubší dystrofické změny jaterní tkáně. Kyselina orotová a její soli se vyskytují např. v mléce přežvýkavců, kde jsou výsledkem činnosti střevních bakterií, u vyšších živočichů je kyselina orotová součástí intermediárního metabolismu – dráhy biosyntézy pyrimidinů. Není jasné, zda existuje její fyziologická potřeba a případně v jakých dávkách [15]. V literatuře se vyskytují jen sporadické zmínky o léčbě fraktur dlouhých kostí kalium orotátem [16] i o rychlé resorpci značené kyseliny orotové v regenerující kostní tkáni [17,18,19]. Naše výsledky naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou ve srovnání s kontrolními potkany nemění v žádném sledovaném místě BMD, tlumí však nesignifikantně tvorbu kostního kolagenu (PINP), přispívá nesignifikantně k šířce diafýzy, ale především vede ke zvýšení síly nutné ke zlomení femuru a krčku femuru.

Závěry

Naše výsledky naznačují, že dieta obohacená o kyselinu orotovou tlumí tvorbu kostního kolagenu, a tím i hodnoty kostní minerální denzity, ale tyto změny jsou následované

Tabulka 3

Ukazatele kostního obratu z homogenátu kostí ($\mu\text{g/l}$)

	Osteokalcin	PINP	CTX
SD	2,07 $\pm$ 0,07	43,84 $\pm$ 4,86	0,91 $\pm$ 0,09
CHOL	2,46 $\pm$ 0,10	48,05 $\pm$ 4,12	0,84 $\pm$ 0,05
MCDD	2,11 $\pm$ 0,29	48,35 $\pm$ 6,83	0,91 $\pm$ 0,20
OA	2,56 $\pm$ 0,07	36,49 $\pm$ 4,39	0,91 $\pm$ 0,07

Tabulka 4

Délka a šířka femuru (mm)

	Délka	Šířka
SD	34,240 $\pm$ 0,324	3,177 $\pm$ 0,0421
CHOL	34,327 $\pm$ 0,607	3,107 $\pm$ 0,0472
MCDD	34,320 $\pm$ 0,205	3,283 $\pm$ 0,0436
OA	34,430 $\pm$ 0,110	3,240 $\pm$ 0,1000
	ns	ns

zvýšenou odolností kostí ke zlomení u samců potkanů kmen Wistar. Dieta bez cholinu a methioninu (nahrazeno argininem) vedla k nálezům vyšší BMD a hodnot PINP, ale nebyla následována zlepšením pevnosti kostí. Tyto kosti se jeví jako křehčí.

Poděkování: Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura

- Remen KM, Henning P, Lerner UH et al. Activation of Liver X Receptor (LXR) Inhibits Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL)-induced Osteoclast Differentiation in an LXR β -dependent Mechanism J Biol Chem 2011;286:33084–33094.
- Iwamoto J, Seki A, Sato Y et al. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bone mass and hepatic lipids in rats with combined methionine-choline deficiency. Bone 2011;48:1015–1021.
- Gorustovich A, de los Espósito M, Guglielmotti MB, Giglio MJ. Periimplant bone healing under experimental hepatic osteodystrophy induced by a choline-deficient diet: a histomorphometric study in rats. Clin Implant Dent Relat Res 2003; 5:124–129.
- Gorustovich AA, Espósito MA, Guglielmotti MB, Giglio MJ. Mandibular bone remodeling under a choline-deficient diet: a histomorphometric study in rats. J Periodontol 2003;74:831–837.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 1993;14:595–608.
- Gradosova I, Zivna H, Svejkovska K, Palicka V, Tichý A, Zivny P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. Pharmazie 2011;66: 606–610.
- Romestaing C, Piquet MA, Bedu E et al. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. Nutr Metab (Lond). 2007;4:4.
- Yu J, Chu ES, Hui AY et al. Lipoprotein lipase activator ameliorates the severity of dietary steatohepatitis. Biochem Biophys Res Commun 2007;356:53–59.
- Hebbachi AM, Seelaender MC, Baker BW, Gibbons GF. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. Biochem J 1997;325 (Pt 3):711–719.
- Su GM, Fiala-Beer E, Weber J et al. Pretranslational upregulation of microsomal CYP4A in rat liver by intake of a high-sucrose, lipid-devoid diet containing orotic acid. Biochem Pharmacol 2005;69:709–717.
- Aoyama Y, Wada M, Morifuji M. Orotic acid added to casein, but not to egg protein, soy protein, or wheat gluten diets increases 1,2-diacylglycerol levels and lo-

- wers superoxide dismutase activities in rat liver. *Biosci Biotechnic Biochem* 2001; 65:2166–2173.
12. Anan K, Mitsuyama S, Yanagita Y et al. Effects of toremifene and anastrozole on serum lipids and bone metabolism in postmenopausal females with estrogen receptor-positive breast cancer: the results of a 2-year multicenter open randomized study. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:775–781.
13. Ackert-Bicknell CL. HDL cholesterol and bone mineral density: Is there a genetic link? *Bone* 2011; 9: 4C; doi:10.1016/j.bone.2011.07.002
14. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res* 2005;70:129–136.
15. Kreuzer M, Vertesy E, Kirchgessner M. Response of renal orotic acid and creatinine to treatments affecting metabolic protein supply of ruminants. *Arch Tierernähr* 1995;48:135–146.
16. Jeevanandam M, Begay CK, Holaday NJ, Petersen SR. Nutritional and metabolic effects and significance of mild orotic aciduria during dietary supplementation with arginine or its organic salts after trauma injury in rats. *Metabolism* 1997;46: 785–792.
17. Kuzdenbaeva RS, Sha khiev USh, Utegenov BA, Rystina SA. Effect of potassium orotate on the metabolism of various vitamins in patients with long bone fractures. *Farmakol Toksikol* 1982;45:76–77.
18. Kuzdenbaeva RS, Sha khiev USh, Utegenov BA. Potassium orotate and polyvitamins in the treatment of fractures. *Ortop Travmatol Protez* 1981;8:24–28.
19. Matveenko VN. Biosynthesis of pyrimidine nucleotides in normal and regenerating bone tissue. *Vopr Med Khim* 1980;26:162–165.