

Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostní tkáně u intaktních potkanů – samců

H. ŽIVNÁ¹, P. ŽIVNÝ², K. ŠVEJKOVSKÁ-KUBÍKOVÁ², S. FEKETE², M. HOLEČEK³

¹Radioizotopové laboratoře a vivárium, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové;

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova;

³Ústav fyziologie, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

SOUHRN

Živná H., Živný P., Švejkovská-Kubíková K., Fekete S., Holeček M.: **Vliv krátkodobého hladovění na metabolismus kostní tkáně u intaktních potkanů – samců**

Cíl: Sledovali jsme vliv 24-hodinového hladovění na kostní metabolismus u intaktních potkanů samců kmene Wistar.

Materiál a metody: Potkani byli rozděleni do 2 skupin po 10 potkanech. Živení po dobu 12 týdnů standardní laboratorní dietou (ST1) *ad libitum*: 1. skupina **ST1-S** živena do okamžiku usmrcení. 2. skupina **ST1-H24** hodin před usmrcením hladověla. Potkani byli usmrceni vykrvácením z břišní aorty, poté byla u potkanů stanovena kostní minerální hustota (BMD; g/cm²) a složení těla dvouenergiovou rentgenovou absorpciometrií. Biomechanická odolnost kostí byla měřena přístrojem vyrobeným na zakázku. V homogenátu kostí byly stanoveny ukazatele kostního obrátu: N terminální propeptid prokolagenu I. typu PINP, kostní frakce alkalické fosfatázy BALP, kostní morfogenetický protein BMP-2, karboxyterminální telopeptid kolagenu CTX a insulin like growth factor (IGF-I).

Výsledek: Významný úbytek tělesné hmotnosti a tukové tkáně byl zjištěn u hladovějící skupiny ve srovnání s potkany **ST1-S**. Tloušťka kosti a síla nutné ke zlomení torzí pravé tibie byla menší u ST1-H ve srovnání s ST1-S. Rozdíly v koncentraci markerů z kostního homogenátu mezi skupinami nebyly nalezeny.

Závěry: Domníváme se, že potkani živení standardní laboratorní dietou mají zajištěnu tvorbu přiměřeného množství tukové tkáně, která je během hladovění metabolizována. Úbytek tukové tkáně pomáhá šetřit svalovou i kostní tkáň.

Klíčová slova: hladovění, kostní markery, hustota kostního minerálu, biomechanické testování

SUMMARY

Živná H., Živný P., Švejkovská-Kubíková K., Fekete S., Holeček M.: **Effect of short-term fasting on bone metabolism in intact male rats**

Objective: The effect of 24-hour starvation on bone metabolism in intact male Wistar rats was monitored.

Material and methods: The rats were divided into 2 groups of 10 rats and fed for 12 weeks with a standard laboratory diet (ST1) *ad libitum*. The first group (ST1-S) was fed ST1 until sacrifice. In the 2nd group (ST1-H), ST1 was discontinued 24 hours before sacrifice. Rats were sacrificed by bleeding from the abdominal aorta, after which bone mineral density (g/cm²) and body composition were determined by dual-energy X-ray absorptiometry. Biomechanical bone resistance was measured using a custom-made device. The following markers of bone turnover were determined in bone homogenates: procollagen I N-terminal propeptide, bone fraction of alkaline phosphatase, bone morphogenetic protein 2, carboxyl-terminal collagen cross-links and insulin-like growth factor 1.

Results: A significant loss of body weight and adipose tissue was found in the starving group compared to ST1-S rats. The bone thickness and torsion force required to break the right tibia were lower for ST1-H compared to ST1-S. There were no differences in the concentration of markers assessed in bone homogenate between the groups.

Conclusion: We believe that rats fed with a standard laboratory diet have adequate amounts of adipose tissue that is metabolized during fasting. The loss of adipose tissue helps save muscle and bone tissue.

Keywords: starvation, bone markers, bone mineral density, biomechanical testing

Osteologický bulletin 2017; 22(4):136–141

Adresa: Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc., Fakultní nemocnice Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: zivny@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 4. 12. 2017

Přijato k tisku: 19. 2. 2018

Úvod

Většina prací se věnuje dlouhodobým účinkům látek na kvalitu kostní tkáně, na kostní metabolismus. Předpokládá se, že než se projeví vliv látek na kosti, tak uplynou týdny.

Hladovění má tři fáze [1]. První fáze lačnění u člověka začíná ihned po stravení požitého jídla, nastupuje pocit hladu a bývá 3× denně. Je čerpána energie z glykogenu.

Ve druhé fázi hladovění, tj. po 12 hodinách hladovění je polovina energie získána z volných mastných kyselin (FFAs) spíše než glukózy [2]. Uvolňuje se glycerol a volné mastné kyseliny pro glukoneogenezi [3] a pro β -oxidaci [1]. Ve třetí fázi hladovění již nestačí ketolátky k udržení bazálního metabolismu a začne se metabolizovat svalová tkáň [1,4].

Fyziologické změny pozorované při hladovění ukazují především pokles IGF-I a estrogenu a zvýšení Peroxisome proliferator – activated receptor gamma (PPAR γ), což se ukazuje jako stimul pro prekurzorové buňky k přesunu od osteoblastů k adipocytům [5,6].

Během hladovění se z jater uvolňuje Fibroblast growth factor-21 (FGF-21), který stimuluje oxidaci mastných kyselin v játrech, ketogenezi, citlivost buněk na inzulín, blokuje efekt STH a je příčinou úbytku kostí. FGF-21 primárně tlumí cestu IGF-I v játrech [7].

Hladovění stimuluje tvorbu ROS (Reactive Oxygen Species), především H_2O_2 . H_2O_2 je esenciální pro au-

tofagii při hladovění [8], H_2O_2 ve vysoké dávce vede k buněčnému poškození, ale v nízké dávce má důležitou roli jako signální molekula při biologických procesech [9].

Hladovění tlumí gen Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), který fyziologicky snižuje tvorbu autofagosomů, a tím brání apoptóze buňky [10]. Exprese Bcl-2 proteinu, anti-apoptotického proteinu, který mění propustnost membrán, je zvýšena v přirozeně stárnoucích buňkách, kde se zastavuje růst [11].

Jednou z potřeb odbourávání kostí při hladovění je poskytnutí minerálů do tělesných tekutin, především vápníku. Vápník je zásadní pro buněčnou fyziologii a jeho nedostatečný příjem rychle stimuluje kostní resorpci s uvolněním z kostního hydroxyapatitu [12]. Druhým důvodem úbytku kostí je mechanická teorie [13]. Pokud jedinec méně váží, pak je i méně zatížena kostra a může se spustit kostní resorpce endostálně [14,15].

Kostní metabolismus je nejčastěji sledován stanovením hladin markerů kostního obratu. Mezi specifické markery, odrážející kostní metabolismus patří kostní alkalická fosfatáza, (BALP), osteokalcin (OC) a N- a C-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, PICP). BALP je lokalizována v membránách osteoblastů [16]. PINP je propeptid z prokolagenu I před jeho zabudováním do kostní hmoty ve formě kolagenu I, také odráží kostní novotvorbu [17]. Naopak při odbou-

Tabulka 1
Vliv hladovění na tělesnou hmotnost, složení těla a obsah tuku ($m \pm SD$)

	Hmotnost zvířat na konci pokusu (g)	Lean BMC (g)	Tuk (g)	Tuk (%)
ST1-S	516 $\pm$ 13	342 $\pm$ 28	75 $\pm$ 18	17,8 $\pm$ 4,1
ST1-H	479 $\pm$ 15 vs. ST1-S $p \leq 0,001$	343 $\pm$ 28	51 $\pm$ 18	12,6 $\pm$ 3,7 vs. ST1-S $p \leq 0,05$

Tabulka 2
Vliv hladovění na kostní minerální hustotu (g/cm^2 ; $m \pm SD$)

	DXA total	Th páteř	Levý femur	Pravý femur
ST1-S	0,170 $\pm$ 0,028	0,225 $\pm$ 0,091	0,203 $\pm$ 0,132	0,201 $\pm$ 0,161
ST1-H	0,169 $\pm$ 0,031	0,221 $\pm$ 0,098	0,185 $\pm$ 0,072	0,184 $\pm$ 0,120

rávání kolagenu I se uvolňuje C-terminální telopeptid kolagenu I (CTX-I), což vypovídá o resorpci kostní tkáně [18]. Další faktor, kostní morfogenetický protein (BMP-2) podporuje expresi a diferenciaci osteoblastů s následným zvýšením kostní novotvorby [19]. Inzulinu podobný růstový faktor IGF-I se účastní kostní novotvorby a stimuluje osteoformaci při osteoresorpci [20].

Položili jsme si otázku, jestli i krátkodobá změna odnětí potravy na 24 hodin bude mít vliv na kostní metabolický obrát u potkanů.

Pro zjištění účinku krátkodobého hladovění na kostní tkáň byli v této studii použiti zdraví samci potkanů, u kterých není metabolismus kostí negativně ovlivněn ani nedostatkem anabolických hormonů, ani jiným patologickým stavem.

Materiál a metody

Zvířata:

Studie byla provedena podle projektu pokusů schváleného Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK – HK (č.j. 30793/2010-30 a 8593/2008-30). Byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice) s tělesnou hmotností 235 ± 7 g na začátku pokusu. Potkani byli ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK – HK) umístěni po 5 v plastických klecích a chováni za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %, pitná voda ad libitum). Po dobu 12 týdnů byli potkani živeni ad libitum standardní dietou pro hlodavce (ST-1, VELAS, Lysá nad Labem).

Experiment:

Potkani byli rozděleni do dvou skupin po 10 zvířatech:

1. Skupina ST1-S živena po dobu 12 týdnů standardní laboratorní dietou (ST1).
2. Skupina ST1-H živena po dobu 12 týdnů dietou ST1 ad libitum a 24 hodin před usmrcením byla všechna dieta odebrána a ponechána pouze pitná voda ad libitum. Tělesná hmotnost potkanů a spotřeba diety byla sledována jednou týdně. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové anestézii.

Hustota kostního minerálu:

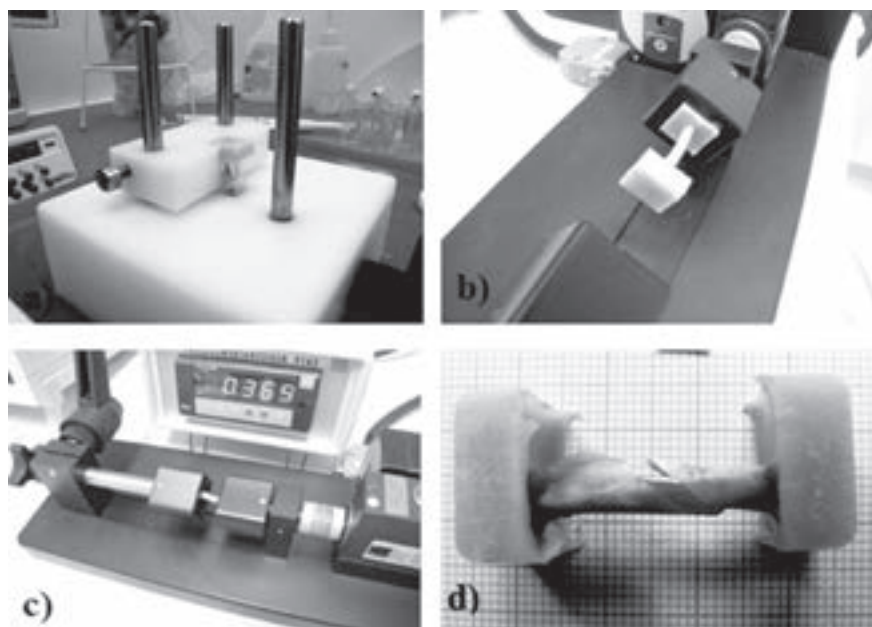
Potkanům byla po jejich usmrcení změřena kostní minerální hustota (BMD, g/cm²) pomocí dvouenergievé rentgenové absorpciometrie (DXA – Dual Energy X-ray Absorptiometry) na přístroji Hologic Delphi A (Hologic, MA, USA) v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. Kostní minerální hustota celého těla, v oblasti bederních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA, Hologic, MA, USA).

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně:

Vyňaté tibie byly zamrazeny na -80 °C do dalších analýz. Tibie byly využity k testování mechanické odolnosti kostní tkáně na speciálním elektromechanickém přístroji (Martin Košek & Pavel Trněčka, Hradec Králové, ČR) podle metodiky popsané dříve [21,22]. Před testováním jsme změřili délku a průměr vyšetřovaných kostí. Tibie byly lámány ve středu diafýzy pomocí tříbodového testování (three-point bending). Kost byla položena na dva podpůrné body, vzdálené od sebe 18 mm v anteroposteriorním směru. Kost byla nejprve vystavena počáteční síle do 10 N a poté byl spuštěn elektromotor s konstantní rychlostí 6 mm/min. Po zlomu jsme změřili tloušťku kortikální části kosti pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0–25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie). Maximální vynaložená síla (v tlaku N) vedoucí ke zlomu kostí byla zaznamenána měřicí jednotkou (Digitalanzeiger 9180, Burster praezisionsmesstechnik GmbH & Co KG, Gernsbach, Německo).

Při přípravě zlomení torzí se konec tibie svisle fixuje ve formě a zalije se samopolymerující adhezivní pryskyřicí na bázi metakrylá-

Obr. 1



Tabulka 3
Vliv hladovění na mechanické vlastnosti a odolnost kostní tkáně tibií (m ± SD)

	Skupina	Délka (mm)	Průměr (mm)	Třibodové ohýbání (N)	Tloušťka kortikální kosti (mm)	Fraktura) a torze tibiae (N)
LT	ST1-S	40,73 ± 1,51	2,75 ± 0,37	130,5 ± 18,4	0,521 ± 0,009	–
	ST1-H	40,92 ± 0,94	2,71 ± 0,18	126,1 ± 11,4	0,535 ± 0,022	–
PT	ST1-S	39,71 ± 0,37	2,90 ± 0,28	–	0,541 ± 0,094	297,4 ± 13,3
	ST1-H	41,15 ± 0,82	2,72 ± 0,18	–	0,526 ± 0,015 vs. ST1-S p = 0,027	259,5 ± 31,2 vs. ST1-S p = 0,003

LT – levá tibia, PT – pravá tibia

Tabulka 4
Vliv hladovění na koncentrace kostních markerů v kostním homogenátu, PINP pg/ml; BALP ng/ml; BMP-2 pg/ml; CTX ng/ml a IGF-1 pg/ml; m ± SD nebo medián a 25. a 75. percentily)

	PINP	BALP	BMP-2	CTX1	IGF-1
ST1-S	151,3 145,5–179,2	5,27 3,80–5,48	22,27 ± 3,66	6 745 5 050–9 881	1 387 1 096–2 850
ST1-H	154,6 101,4–237,7	3,89 2,28–4,94	23,65 ± 8,22	6 308 4 633–11 504	1 497 973–2 195

tu (Spofacryl-SpofaDental, a. s.; Jičín) ve speciální nádobce (obrázek 1). Po pěti minutách metylmetakrylát ztuhne a postup se opakuje s druhým koncem tibiae (a). Střed kosti je po celou dobu obalen gázou namočenou ve fyziologickém roztoku. Upravené konce kostí se zasunou do držáků přístroje (b). Po spuštění přístroje se začne jedna jeho část otáčet rychlostí 24°/min. až dojde ke zlomení tibiae v torzi a na obrazovce zůstane zobrazena hodnota, při které došlo ke zlomení kosti (vyjádřeno v N/m – c, d).

Analýza kostních homogenátů:

Homogenát kosti byl připraven z proximální části tibiae (0,15 g) v 1,5 ml fosfátového pufru (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) na přístroji MagNA Lyser (Roche) ve třech cyklech při 6 500 rpm po dobu 20 sekund. Mezi každým cyklem byly vzorky chlazeny v chladícím kruhu (MagNA Lyser Cooling Block). V kostním homogenátu byly stanoveny koncentrace kostních markerů: N-terminální propeptid prokolagenu I (PINP; pg/ml), karboxyterminální telopeptid kolagenu I (CTX-I; pg/ml), kostní forma izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP; ng/ml), kostní morfogenetický faktor 2 (BMP-2; pg/ml) a Insulin Like Growth Factor I (IGF-I; pg/ml) metodou ELISA s využitím kitů od firmy Uscn Life Science Inc., Wuhan,

Čína. Analýzy byly provedeny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Statistická analýza:

Výsledky 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 ± směrodatná odchylka (SD), v případě neparametrických hodnot jako medián a 25. a 75. percentil. Hodnoty p < 0,05 a nižší byly považovány za signifikantní.

Výsledky

Během experimentu se u rostoucích potkanů fyziologicky zvyšovala tělesná hmotnost (hodnoty nejsou prezentovány). U skupiny hladovějící 24 hodin před ukončením pokusu došlo ke statisticky významnému poklesu tělesné hmotnosti (p ≤ 0,001) ve srovnání s potkany, kteří měli přístup k dietě až do chvíle jejich usmrcení. Podobně po 24 hodinách hladovění u skupiny ST1-H jsme našli statisticky významný pokles obsahu tukové tkáně v těle (p ≤ 0,05) ve srovnání se skupinou potkanů, která do doby usmrcení měla přístup k dietě ad libitum (tabulka 1).

Vyhodnocením denzitometrických měření jsme ne-nalezli statisticky významné rozdíly mezi skupinou potkanů živenou ad libitum a skupinou, která hladověla 24 hodin před usmrcením, pouze se ukázal trend k nižším hodnotám u hladovějících potkanů (*tabulka 2*).

Tloušťka kortikální kosti levé tibie (**LT**) byla u hladovějící skupiny větší než u skupiny, která měla do ukončení experimentu přístup k dietě. Tloušťka kosti pravé tibie (**PT**) byla statisticky významně menší u skupiny ST1-H ve srovnání se skupinou živenou ad libitum (*tabulka 3*).

Nenalezli jsme statisticky významné rozdíly v koncentraci markerů z kostního homogenitu mezi skupinou živenou ad libitum a skupinou, která hladověla 24 hodin před usmrcením. Zjistili jsme pouze trend k poklesu hodnot BALP u hladovějící skupiny ve srovnání se skupinou sytou (*tabulka 4*).

Diskuze

V našem experimentu jsme chtěli zodpovědět otázku, zda může i akutní hladovění ovlivnit metabolismus kostí. Sledované skupiny potkanů se po celou dobu experimentu nelišily v tělesné hmotnosti, pouze po 24 hodinách hladovění poklesla tělesná hmotnost i obsah tukové tkáně v těle. Na poklesu hmotnosti se jistě podílelo i vyprázdnění obsahu trávicího traktu. Při dlouhodobém hladovění potkanů bychom jistě dosáhli statisticky významných rozdílů, ale to nebylo naším cílem. Většinou lidé hladoví krátkodobě, např. před operačním zákrokem nebo vyšetřením.

Předpokládáme, že potkani se po 24 hodinách hladovění, s ohledem na rychlost metabolismu, nalézali v druhé fázi, kdy ze svých tukových zásob spotřebovali 15 %. Tehdy je energie získávána z mastných kyselin z odbourané tukové tkáně [2]. Uvolňuje se glycerol a volné mastné kyseliny pro glukoneogenezi [3] a pro β -oxidaci [1].

Vzhledem k tomu, že osteoblasty a adipocyty pocházejí z téže populace mezenchymálních kmenových buněk [23], je mezi nimi udržována dynamická rovnováha, pak odklon od linie osteoblastů vede ke zvýšené produkci adipocytů [24,25]. V současné době je tuková tkáň chápána nejen jako pasivní zdroj energie, ale produkcí adipokinů má mnoho dalších důležitých úloh v organismu. Podílí se na řadě různých funkcí, včetně metabolismu kostí [26]. Můžeme očekávat, že tuková tkáň uložená v kostní dřeni bude při hladovění pomáhat obnovení a udržení funkce osteoblastů [13,27]. Úloha osteocytů není vázána jen na kostní tkáň, ale zasahuje i do metabolismu tuků, a dokonce i do lymfopoézy [28].

Mnohé práce se podrobně zabývají procesy hladovění. Narůstají počty receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory gamma (PPAR γ) preferující adipocyty [5,6], klesají koncentrace IGF-I, čímž se spouští odbourávání [7]. Reaktivní formy kyslíku

(ROS) zvyšují autofagii při hladovění. Někteří autoři tvrdí, že ROS během hladovění narůstají [8], jiní tvrdí, že naopak klesají [29].

Mechanická teorie je určitě platná při dlouhodobém hladovění, kdy dojde k poklesu tělesné hmotnosti [13]. Lehčí kostra při snížené tělesné hmotnosti může být důsledkem kostní endosteální resorpce [14,15]. Můžeme se domnívat, že již po 24 hodinách hladovění reaguje i kostní tkáň poklesem své pevnosti, kdy poklesly síly nutné ke zlomení pravé tibie torzí u hladovějící skupiny. Toto zjištění by znamenalo, že již po 24 hodinách hladovění může organismus potkana registrovat pokles tělesné hmotnosti s patřičným odrazem v pevnosti kostní tkáně. Tuto hypotézu bude ještě nutné ověřit.

V našem experimentu poklesla statisticky významně tloušťka kortikální kosti pravé tibie. Ale naopak tloušťka kortikální kosti levé tibie se zvýšila. Tento jev, velmi často pozorovaný v našich experimentech, by mohl vypovídat o různém zatížení levých – pravých končetin potkana, pravděpodobně o dominantnosti levé nebo pravé mozkové hemisféry.

Zjistili jsme významný pokles množství tuku v těle a nevýznamný pokles hodnot BMD ve všech sledovaných oblastech u skupiny ST1-H. Naše výsledky jsou ve shodě s Rosenem, který u myši neprokázal korelace mezi stehenní BMD a množstvím adipocytů [30].

Závěr

Domníváme se, že při krátkodobém hladovění u potkanů s dostatkem tukové tkáně je kostní tkáň šetřena a není nucena přeměňovat metabolismus kostí ke zvýšené osteoresorpci.

Poděkování

Tato studie byla podpořena granty UHHK 00179906 a SVV 260689.

Autoři děkují Dagmar Ježkové a Kateřině Šildbergové za jejich obratnou technickou pomoc během celého experimentu.

Literatura

- McCue MD. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2010;156:1–18.
- Newsholme EA, Leech AR. *Functional biochemistry in health and disease*. Chichester, UK; Hoboken, N. J. Wiley-Blackwell 2009; p 543.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 2003;278:30413–30416.
- Wang T, Hung CC, Randall DJ. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu Rev Physiol* 2006;68:223–251.
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 1996;19:421–428.
- Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ et al. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *J Cell Biochem* 1999;74:357–371.

7. Zhang Y, Xie Y, Berglund ED et al. The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife* 2012; 15;1:e00065. doi: 10.7554/eLife.00065.
8. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBOJ* 2007;26(7):1749–1760.
9. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26(1):1–14.
10. García-Navas R, Munder M, Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy* 2012;8(11):1557–1576.
11. Tombor B, Rundell K, Oltvai ZN. Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303(3):800–807.
12. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005; 187:311–325.
13. Devlin MJ. Why does starvation make bones fat? *Am J Hum Biol* 2011;23(5):577–585.
14. Frost HM. Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *Anat Rec* 1987;219:1–9.
15. Frost HM. Bone’s mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;275:1081–1101.
16. Brown JP, Albert C, Nassar BA et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2009; 42(10–11):929–942.
17. Garner JM, Jordan JR. An unusual complication of malar augmentation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008;61(4):428–430.
18. Herrmann M, Seibel 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.
19. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(1):3–18.
20. Swarthout JT, Tyson DR, Jefcoat SC Jr, Partridge NC. Induction of transcriptional activity of the cyclic adenosine monophosphate response element binding protein by parathyroid hormone and epidermal growth factor in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2002;17(8): 1401–1407.
21. Gradosova I, Zivna H, Svejkovska K et al. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 2011;66: 606–610.
22. Živný P, Švejková K, Gradošová I et al. Možnosti určení mechanické odolnosti kosti v experimentu – souhrn poznatků. *Osteol Bull* 2011; 16:132–136.
23. Hong JH, Hwang ES, McManus MT et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005;309: 1074–1078.
24. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:236–253.
25. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:290–294.
26. Scotece M, Conde J, Abella V et al. Bone metabolism and adipokines: are there perspectives for bone diseases drug discovery? *Expert Opin Drug Discov* 2014;9:945–957.
27. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res* 2010;25:2078–2088.
28. Sato M, Asada N, Kawano Y et al. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab* 2013;18(5):749–758.
29. Desideri E, Vegliante R, Cardaci S et al. MAPK14/p38 -dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation. *Autophagy* 2014;10(9).
30. Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19:109–124.