

Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar

I. GRADOŠOVÁ¹, K. ŠVEJKOVSKÁ¹, H. ŽIVNÁ², P. ŽIVNÝ¹, E. ČERMÁKOVÁ³,
A. TICHÝ⁴, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové,

²Vivárium a Radioizotopové laboratoře, LF UK a FN Hradec Králové, ³Oddělení výpočetní techniky, LF UK a FN Hradec Králové,

⁴Katedra radiobiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

SOUHRN

Gradošová I., Švejkovská K., Živná H., Živný P., Čermáková E., Tichý A., Palička V.: **Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar**

Cíl práce: Cílem studie bylo sledovat vliv často užívaného léčiva ze skupiny antihypertenziv – metoprololu (β_1 -selektivní blokátor adrenergických receptorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity) na kostní metabolismus u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar.

Materiál a metody: Zdravým dospělým samcům potkanů kmene Wistar (240 ± 10 g) byl podáván metoprolol perorálně 1x denně žaludeční sondou po dobu 8 týdnů. Potkani byli rozděleni do 2 skupin po 8 zvířatech. Kontrolní skupině (KON) byla podávána *aqua pro injectione* (0,2 ml/100 g BW), experimentální skupině byl podáván metoprolol (MET; 0,5 mg v 0,2 ml *aqua pro inj.*/100 g BW) ve formě suspenze. Vyšetřovali jsme v séru ukazatel kostní resorpce: karboxyterminální telopeptid kolagenu I (ICTP) a ukazatele kostní novotvorby: osteokalcin (OC), kostní formu izoenzymu alkalické fosfatázy (BALP) a aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) pomocí metody ELISA. Z homogenátu kosti proximální části tibie byl stanoven BMP-2 metodou Western blot. Změřili jsme hustotu kostního minerálu (BMD) pomocí dvouenergievé rtg absorpciometrie (DXA) a na femurech jsme testovali mechanickou odolnost kostní tkáně.

Výsledek: U skupiny MET došlo po 8 týdnech k poklesu tlakové odolnosti krčku femuru o 21 % v porovnání s KON. Expres BMP-2 v kosti se zvýšila. V hodnotách BMD a koncentracích kostních markerů nebyly zaznamenány významné změny.

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že metoprolol ovlivňuje kostní tkáň u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar snížením odolnosti kostní tkáně v oblasti krčku femuru a zvýšenou expresí BMP-2 v proximální části tibie.

Klíčová slova: metoprolol, kostní markery, DXA, testování mechanické odolnosti kostní tkáně, Western blot

SUMMARY

Gradošová I., Švejkovská K., Živná H., Živný P., Čermáková E., Tichý A., Palička V.: **Effect of metoprolol on bone tissue in adult male Wistar rats**

Objective: The study aimed at assessing the effect of a frequently used antihypertensive, metoprolol (a β_1 -selective blocker of adrenergic receptors devoid of internal sympathomimetic activity), on bone metabolism in healthy adult male Wistar rats.

Material and methods: Healthy adult male Wistar rats (240 ± 10 g) were administered metoprolol orally once daily by gastric tube for 8 weeks. The rats were divided into two groups of eight animals. The control group (CON) was given water for injection (0.2 mL/100 g BW) and the study group received metoprolol (MET; 0.5 mg in 0.2 mL of water for injection/100 g BW) in the form of a suspension. In the serum, a bone resorption marker carboxy-terminal telopeptide of collagen type I (ICTP) and bone formation markers osteocalcin (OC), alkaline phosphatase bone isoenzyme (BALP) and amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) were assessed using the ELISA method. A bone homogenate from the proximal tibia was used to measure BMP-2 by the Western blot. Bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Mechanical resistance of bone tissue was tested on the femurs.

Results: In the MET group, resistance to pressure of the femoral neck decreased by 21 % after 8 weeks, as compared with the CON group. Expression of BMP-2 in the bone increased. No significant changes were observed in BMD and bone marker concentrations.

Conclusion: The results suggest that metoprolol affects bone tissue in healthy adult male Wistar rats by decreasing the resistance of bone tissue in the femoral neck and by increased expression of BMP-2 in the proximal tibia.

Keywords: metoprolol, bone markers, DXA, tests of mechanical resistance of bone tissue, Western blot

Osteologický bulletin 2011;16(1):3–7

Adresa: Mgr. Iveta Gradošová, Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, gradosovai@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 14. 1. 2011

Přijato k tisku: 13. 4. 2011

Úvod

Příčiny špatného stravování a nesprávného životního stylu vedou ke vzniku tzv. civilizačních chorob, mezi které patří mimo jiné také kardiovaskulární onemocnění (KVO) a osteoporóza. Vysoký krevní tlak je jednou z hlavních příčin vzniku KVO. Arteriální hypertenzi lze korigovat několika skupinami léků. Prozatím nebyla věnována velká pozornost skutečnosti, zda a jak tyto léky ovlivňují kostní metabolismus.

Kost je dynamický orgánový systém, který po celou dobu života jedince podléhá neustálé remodelaci, kterou regulují buňky kostní novotvorby – osteoblasty a kostní resorpce – osteoklasty. Vlivem různých léků může dojít k narušení správné remodelace kostní tkáně, vedoucí až ke vzniku osteoporózy. OP je definovaná podle Světové zdravotnické organizace jako progredující systémové onemocnění skeletu, charakterizované úbytkem kostní hmoty, spojené s poruchou mikroarchitektury kostní tkáně a její zvýšenou náchylností k frakturám [1]. Studie prováděné na zvířatech a klinické studie naznačují, že vysoký krevní tlak je spojován s abnormalitami v metabolismu vápníku, vedoucí k jeho ztrátám

močí, sekundárně k nárůstu produkce parathormonu a k zvýšenému uvolňování vápníku z kosti, což zvyšuje riziko vzniku osteoporózy [2,3,4].

Mezi antihypertenzní léčiva patří kromě jiných β -blokátory. Mechanismus účinku snižování krevního tlaku spočívá v tom, že β -blokátory snižují srdeční výdej v důsledku blokády srdečních β_1 -receptorů, což má za následek pokles srdeční frekvence a snížení kontraktility myokardu, a to vede ke snížení nároků myokardu na kyslík. Proto beta-blokátory mají současně antiarytmický a antiangiogenní účinek [5]. Metoprolol je lipofilní β_1 -selektivní blokátor adrenergních receptorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity a zmírňuje účinky zvýšené sympatomimetické aktivity nejen v srdci. Kardioselektivita metoprololu je nespecifická, závisí na poměru afinity účinné látky k oběma typům receptorů [5]. Metoprolol až při vyšších dávkách blokuje β_2 receptory [5], které byly také identifikovány na buňkách osteoblastů a osteoklastů [6,7]. Aktivací sympatického nervového systému, ve kterém figuruje hormon leptin, dochází ke zvýšené produkci norepinefrinu v kostech, který inhibuje aktivitu osteoblastů přes β_2 -adrenergní receptory [7,8]. Tento fakt na-

značuje, že terapie beta-blokátory by měla mít pozitivní vliv na kostní metabolismus.

Mnohé práce naznačují, že beta-blokátory ovlivňují kostní metabolismus [9,10,11,12,13], ale dosud neexistuje jednotný názor, zda jsou prospěšné či nikoliv. Většina studií prokázala spíše pozitivní vliv beta-blokátorů na kostní tkáň snížením rizika fraktur [10,11,12,13] a zvýšením BMD [12]. Informací o vlivu metoprololu na kostní metabolismus je prozatím velmi málo [9,11].

Cílem naší studie bylo zjištění účinku metoprololu (0,5 mg/100 g BW) na kostní tkáň u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar, sledováním ukazatelů kostního obratu: karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I (ICTP), aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP), osteokalcinu (OC) a kostní izoformy alkalické fosfatázy (BALP) v séru.

Sledovali jsme i expresi kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2) v kosti metodou Western blot, měřili hustotu kostního minerálu (BMD) a testovali mechanickou odolnost kostní tkáně.

Materiál a metody

Zvířata

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 HK (č. j. 2709/2009-30).

Tabulka 1

Koncentrace kostních markerů po 8 týdnech podávání metoprololu

Markery kostního obratu	aqua pro inj.		metoprolol		p
BALP (U/l)	12,54	(5,40–16,02)	10,54	(7,83–12,86)	0,66
OC (μg/l)	211,05	(197,80–358,98)	282,28	(210,41–324,67)	0,66
PINP (μg/l)	56,39	(43,84–68,34)	54,02	(36,43–54,02)	0,98
ICTP (μg/l)	68,54	(59,97–73,01)	66,78	(54,93–70,55)	0,98

Tabulka 2

Vliv metoprololu na kostní minerální hustotu (BMD) měřenou pomocí dvouenergové rentgenové absorpciometrie (DXA) po 8 týdnech podávání;

R1 = bederní obratle, R2 = ocasní obratle, R3 = femur

BMD (g/cm ²)	aqua pro inj.		metoprolol		p
R1	0,218	(0,213–0,234)	0,219	(0,199–0,227)	0,44
R2	0,218	(0,217–0,233)	0,229	(0,224–0,236)	0,19
R3	0,187	(0,175–0,210)	0,200	(0,193–0,206)	0,24

Tabulka 3

Výsledky testování mechanických vlastností kostní tkáně pravého femuru

(*p < 0,05)

Měření	aqua pro inj.		metoprolol		p
Délka femuru (mm)	37,0	(37,0–38,0)	38,0	(37,0–38,0)	0,18
Průměr femuru (mm)	3,4	(3,4–3,5)	3,5	(3,4–3,5)	0,35
Three-point bending (N)	199,5	(184,3–205,0)	177,5	(171,5–197,5)	0,35
Maximální tlaková síla zlomení krčku femuru (N)	157,0	(150,8–175,0)	127,0	(111,8–141,8)	*0,002

V pokusu byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárove, ČR) s tělesnou hmotností 240 ± 10 g na počátku pokusu a byli rozděleni do dvou skupin po 8 zvířatech. Potkaní byli umístěni po 4 v plastových klecích a chováni za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %). Byli krmeni standardní laboratorní dietou (ST-1, VELAS, a. s., Lysá nad Labem, ČR) a pitnou vodou *ad libitum*.

Experiment

Metoprolol (Egilok, EGIS PHARMACEUTICALS PLC, Budapešť, Maďarsko) byl podáván 1x denně ve formě suspenze po dobu 8 týdnů žaludeční sondou. Suspenze byla připravena naředěním léku pomocí *aqua pro injectione* (Aqua, Fresenius Kabi Italia S. r. l., Verona, Itálie) a podávána v množství 0,2 ml/100 g BW potkana. Kontrolní skupině (KON) byla podávána *aqua pro inj.* a experimentální skupina potkanů dostávala metoprolol v dávce (MET; 0,5 mg/100 g BW).

Po 8 týdenní aplikaci metoprololu byla potkanům změřena v analgesodaci 0,5 mg/100 g BW midazolamu i.m. (MIDAZOLAM TORREX 5MG/ML; Torrex Chiesi Pharma GMBH, Vídeň, Rakousko) a 10 mg/100 g BW ketaminu i.m. (NARKAMON SPOFA 1%; SPOFA, a. s. Praha, ČR) kostní minerální hustota (BMD, g/cm³) pomocí dvou-energie rentgenové absorpciometrie (DXA – Dual Energy X-ray Absorptiometry) na přístroji Hologic Delphi A v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. Kostní minerální hustota v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA, Hologic, MA, USA).

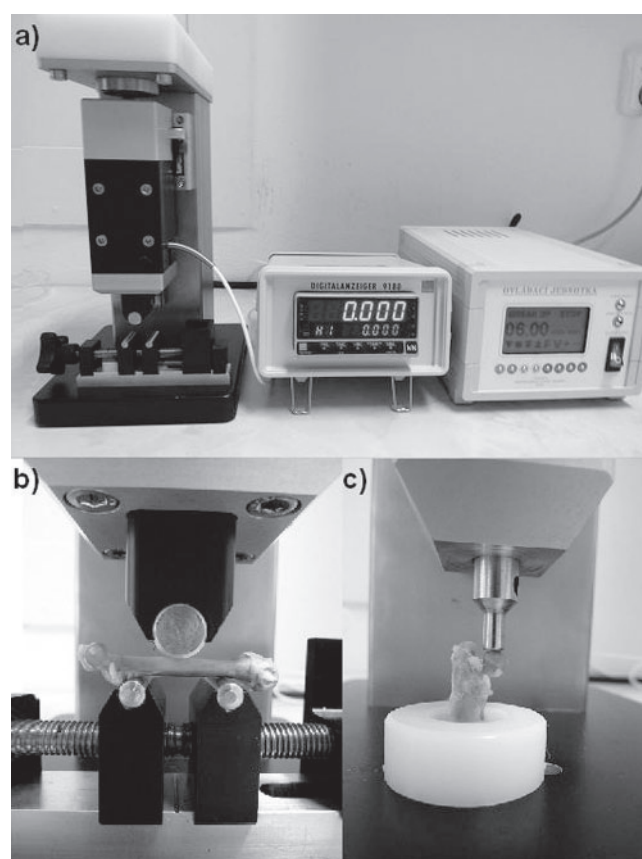
Zvířata byla následně usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v éterové anestezii. V získaném krevním séru jsme stanovili koncentrace markerů kostního obrátu – ICTP, PINP, OC a aktivitu BALP pomocí metody ELISA (Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay) s využitím kitů EIA firmy Immunodiagnostic Systems Ltd., Velká Británie (ICTP, RatLaps™ EIA, µg/l; OC, Rat-MID™ Osteocalcin EIA, µg/l; PINP, Rat/Mouse PINP EIA, µg/l) a Usnlife Sciences & Technology Co., Ltd., Čína (BALP, Rat bone alkaline phosphatase, U/l).

Po usmrcení potkanů byly vyňaty oba femury, zabaleny do gázy zvlhčené fyziologickým roztokem a zmrazeny na -80 °C až do doby analýzy. Právě femury byly využity k testování mechanické odolnosti kostní tkáně na speciálním elektromechanickém přístroji (Martin Košek & Pavel Trněčka, Hradec Králové, ČR) (obr. 1a). Před testováním jsme změřili délku a průměr femuru pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie). Kost byla položena na dva podpůrné body, vzdálené od sebe 18 mm. Femury byly lámány pomocí tříbodového testování (three-point bending) ve středu diafýzy v anteroposteriorním směru (obr. 1b). Kost byla nejprve vystavena počáteční síle do 10 N, a poté byl spuštěn elektromotor s snižující nerezový váleček s konstantní rychlostí 6 mm/min [14]. Po zlomení byly fotograficky zdokumentovány linie lomu femurů.

K testování tlakové odolnosti krčku femuru byla dále využita proximální část kosti. Diafýzu kosti jsme zalili samopolymerující adhezivní pryskyřicí na bázi metakrylátu (Spofacryl-SpofaDental, a. s.; Jičín, ČR) do speciální nádoby, a tím jsme kost zafixovali ve svislé poloze (obr. 1c). Opět byla použita počáteční síla do 10 N a konstantní rychlost posunu tlaku nerezové tyčky se zakulaceným koncem

Obr. 1

- Elektromechanický přístroj na testování mechanické odolnosti kostní tkáně.
- Testování tlakové síly pravého femuru v anteroposteriorním směru ve středu diafýzy pomocí three-point bending testu.
- Zafixovaná diafýza femuru ve speciální nádobce pomocí samopolymerující adhezivní pryskyřice, testování tlakové odolnosti krčku femuru.



Obr. 2

Vliv metoprololu na hladinu BMP-2 proteinu v proximální části tibie, KON = kontrolní skupina, MET = experimentální skupina, která dostávala metoprolol, BMP-2 = kostní morfogenetický protein 2



6 mm/min. Linie lomu krčku femurů byly fotograficky zdokumentovány. Maximální vynaložená síla (N) ke zlomení kostí – diafýzy a krčku femuru – byla zaznamenána měřící jednotkou (Digitalanzeiger 9180, Burster praezisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo).

Ze zvířat po usmrcení byly vyňaty obě tibie, které byly použity pro stanovení hladiny proteinu BMP-2 metodou Western blot. Proximální část kosti (100 mg) jsme homogenizovali v 0,5 ml RIPA pufru (RIPA buffer, Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem směsi proteázových inhibitorů (aprotinin 2 ug/ml, leupeptin 0,5 ug/ml, benzamidin 50 ug/ml – každý v množství 5 ul) na přístroji MagNA Lyser (Roche). Po změření koncentrace proteinů (25 ug) u jednotlivých vzorků byl připraven směsný vzorek tzv. pool z 8 zvířat (200 ug). Následovala elektroforéza SDS-PAGE (separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného), přenos proteinů na polyvinylfluoridovou membránu (Bio-Rad) a imunodetekce BMP-2. Primární protilátka (Rabbit polyclonal to BMP-2, Abcam, Cambridge, Velká Británie) byla použita v ředění 1 : 250 a sekundární protilátka (Polyclonal Swine Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated, Dako, Glostrup, Dánsko) 1 : 1000. Takto označený BMP-2 byl vizualizován chemiluminiscenčně (ECL kit, Roche) s následnou expozicí filmu. Získaný obraz byl naskenován do počítače.

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). Byl použit nepárový t-test k vyhodnocení BMD a Kolmogorov-Smirnov test k vyhodnocení kostních markerů. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián a 25. a 75. percentil. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za signifikantní.

Výsledky

U potkanů, kterým byl podáván metoprolol (MET; 0,5 mg/100 g BW) nedošlo k statisticky významným změnám v koncentracích kostních markerů (*tab. 1*).

Ani vyhodnocením kostní minerální hustoty v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru jsme nezaznamenali signifikantní změnu (*tab. 2*).

Pomocí three-point bending testu v oblasti diafýzy pravého femuru u skupiny MET nedošlo k statisticky významné změně tlakové síly v porovnání s KON. Testováním tlakové odolnosti krčku femuru u experimentální skupiny MET došlo k statisticky významnému poklesu o 21 % v porovnání s kontrolní skupinou (*tab. 3*). Linie lomu v oblasti diafýzy a krčku femuru, které byly posuzovány pouze vizuálně, se od sebe významně nelišily.

U skupiny MET po osmi týdnech podávání metoprololu došlo ke zvýšení exprese BMP-2 v proximální části tibie v porovnání s KON (*obr. 2*).

Diskuze

Pro náš experiment jsme si zvolili metoprolol, jedno z nejčastěji předepisovaných léčiv ze skupiny beta-blokátorů. Vliv metoprololu na kostní metabolismus není dosud prozkoumán. V experimentu byli použiti zdraví dospělí samci potkanů, jejichž kostní metabolismus byl ovlivněn pouze

beta-blokátorem v relativně nízké dávce a v relativně krátkém čase – v porovnání s lidmi, kteří tyto léky užívají dlouhodobě a na jejichž kostní metabolismus navíc působí faktory jak neovlivnitelné, tak ovlivnitelné.

Rejnmark et al. (2004) zjistili, že u žen v perimenopauze došlo po podání beta-blokátorů, mezi kterými byl zahrnut i metoprolol, k trojnásobnému zvýšení rizika fraktury a k signifikantnímu poklesu osteokalcinu v porovnání s neléčenými ženami [9]. V našem experimentu jsme stanovovali změnu v hustotě kostního minerálu ve 3 oblastech skeletu s rozdílným zastoupením trabekulární a kortikální kosti a neprokázali jsme statisticky významnou změnu po 8 týdnech podávání metoprololu. Ačkoli nedošlo ke změně v BMD, prokázali jsme statisticky významný pokles tlakové odolnosti krčku femuru v porovnání s kontrolní skupinou. Pomocí three-point bending testu nebyla zjištěna statistická významnost v tlakové síle ve střední oblasti diafýzy mezi skupinami. Naše výsledky naznačují, že dlouhodobé podávání metoprololu v dávce 0,5 mg/ 100 g BW ovlivňuje kostní tkáň a to především trabekulární část kosti, která je metabolicky aktivnější než kost kortikální i přesto, že naše výsledky nebyly potvrzeny vyšetřením BMD ani změnami sérových hladin kostních markerů a ani nebyly ověřeny histologickou analýzou. Metoprolol tedy nepotvrdil vliv na buňky osteoblastů. Lokálně v kosti došlo k znatelnému nárůstu exprese kostního morfogenetického proteinu 2 v proximální části tibie. BMP-2 je růstový faktor, který umožňuje proliferaci a diferenciaci osteoblastů a novotvorbu kosti [15]. Domníváme se, že zvýšení syntézy BMP-2 je reakcí na změnu (zeslabení) trabekulární části kosti.

Podařilo se nám prokázat, že metoprolol má negativní vliv na mechanickou odolnost kostní tkáně. Naše práce nepodporuje hypotézu většiny prací [10,11,12,13], že β -adrenerní blokátory mohou snížit riziko vzniku zlomeniny a zvýšit BMD.

Studie byla provedena na zdravých potkanech. Do budoucna bude nutné tyto výsledky ověřit na potkanech obou pohlaví s hypertenzí a s indukovanou osteoporózou.

Závěr

Dlouhodobé užívání metoprololu v dávce 0,5 mg/100 g BW má negativní vliv na kostní metabolismus u dospělých samců potkanů kmene Wistar.

Metoprolol v podávané dávce signifikantně snížil tlakovou odolnost krčku femuru u experimentální skupiny a to i přesto, že došlo k zvýšení exprese BMP-2 v proximální části tibie. Domníváme se, že následkem pravděpodobného zeslabení trabekulární části kosti došlo k zvýšené syntéze proteinu BMP-2 v kostní tkáni.

K potvrzení našich výsledků bude nutné další studium této problematiky.

Seznam zkratk:

BALP	kostní forma izoenzymu alkalické fosfatázy (bone alkaline phosphatase)
BMD	kostní minerální hustota (bone mineral density)
BMP-2	kostní morfogenetický protein 2 (bone morphogenetic protein 2)
BW	tělesná hmotnost (body weight)

DXA	dvouenergieová rentgenová absorpciometrie (Dual-Energy X-ray Absorptiometry)
ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ICTP i. m.	karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I intramuskulární
KON	kontrolní skupina
OC	osteokalcin
PINP	aminoterminální propeptid prokolagenu typu I
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
ST-1	standardní laboratorní dieta
SDS-PAGE	separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
MET	metoprolol
NCSS	Number Cruncher Statistical System

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906, grantem Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a projektem Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-62051. Střet zájmů žádný.

Literatura

- Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *American Journal of Medicine* 1991;94(6):646–650.
- Hvarfner A, Bergström R, Mörlin C, Wide L, Ljunghall S. Relationships between calcium metabolic indices and blood pressure in patients with essential hypertension as compared with a healthy population. *J Hypertens* 1987;5(4):451–456.
- Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int* 1985;37(6):605–607.
- McCarron DA, Pingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension* 1980;2(2):162–168.
- Vítovec J, Špinar J et al. Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění. 2. vydání. Praha, Grada, 2004:248.
- Robert E. Moore, Charles K. Smith II, Cathy S. Bailey, Edward F. Voelkel and Armen H. Tashjian Jr. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner* 1993;23(3):301–315.
- Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002;111(3):305–317.
- Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8(2):94–104.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K, Mosekilde L. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcif Tissue Int* 2004;75(5):365–372.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens* 2006;24(3):581–589.
- Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA* 2004;292(11):1326–1332.
- Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2004;19(1):19–24.
- Meisinger C, Heier M, Lang O, Döring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporos Int* 2007;18(9):1189–1195.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14(4):595–608.
- Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8(3):147–159.