Joanna Sadowska

OCENA WPŁYWU ZMIANY SKŁADU DIETY I JEJ SUPLEMENTACJI WITAMINAMI Z GRUPY B NA WYBRANE PARAMETRY METABOLIZMU WAPNIA

BADANIA MODELOWE

Szczecin 2012

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Joanna Sadowska

Ocena wpływu zmiany składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na wybrane parametry metabolizmu wapnia
Badania modelowe

Szczecin 2012

Recenzenci
JOANNA GROMADZKA-OSTROWSKA
WIESŁAWA OROWICZ

Opracowanie redakcyjne
Katarzyna Mitan

WYDANO ZA ZGODĄ
REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE

ISBN 978-83-7663-110-3

WYDAWNICTWO UCZELNIANE ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE
70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449 47 60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl
Druk: PPH „Zapol" Dmochowski, Sobczyk, Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434 10 21
e-mail: zarzad@zapol.com.pl

Książkę tę dedykuję Pani Profesor dr hab. Marioli Friedrich
w podziękowaniu za wskazanie drogi, która prowadzi do celu,
ale też sama w sobie jest warta przeżycia

Nauka prowadzi nas
do zrozumienia tego, jaki jest świat,
a nie tego, jaki chcielibyśmy, by był

Carl Sagan
(1934–1996)

Spis treści

1. Wstęp …….. 7
2. Cel pracy ……. 15
3. Materiał i metody badań ……. 17
4. Wyniki …… 25
5. Dyskusja ……. 33
6. Wnioski ……..….. 51

Piśmiennictwo ……. 53

Summary ……. 65

Zusammenfassung ……... 67

1. Wstęp

Minione stulecie jest nazywane wiekiem techniki i informacji. Z każdym kolejnym tygodniem ilość dostępnych informacji jest coraz większa. Rozwój techniki umożliwia doskonalenie metod badawczych, a wzrastająca dostępność źródeł informacji (telewizja, Internet, czasopisma) sprzyja rozpowszechnianiu zdobywanej wiedzy. W związku z tym coraz dokładniej są poznawane związki przyczynowo-skutkowe pomiędzy spożywaniem żywności o określonym składzie a zdrowiem człowieka. Jednocześnie wiedza ta jest dostępna coraz większej grupie odbiorców.

Prowadzone w Polsce na przełomie lat 90. ubiegłego wieku badania dotyczące oceny sposobu żywienia różnych grup ludności wykazywały, że w analizowanych całodziennych racjach pokarmowych było między innymi zbyt mało wielu witamin i składników mineralnych (Chwojnowska i in. 1993, Friedrich 1997, Szpak i in. 1997, Wierzbicka i in. 1997, Gronowska-Senger i in. 1998, Sadowska i Śliwińska 2005). Dlatego też jednym ze sposobów zapobiegania niedostatecznemu spożyciu witamin i/lub składników mineralnych i korygowania ich niedoborów stało się wzbogacanie nimi produktów spożywczych, czyli dodawanie jednego lub kilku składników odżywczych do produktu bez względu na to, czy występują one w nim naturalnie (Kunachowicz i Troszczyńska 2005).

Wzbogacanie może być obligatoryjne (na przykład dodawanie jodu do soli lub witaminy D do margaryn miękkich) lub dobrowolne. W ostatnich latach wzrasta liczba produktów dobrowolnie wzbogacanych przez producentów w składniki odżywcze (Szponar i in. 2003, Kunachowicz i Troszczyńska 2005, Ratkovska i in. 2007), jednak dodawanie do żywności niektórych składników odżywczych nie zawsze musi być korzystne dla konsumenta. Powstaje bowiem zagrożenie hiperalimentacją, która może wynikać z powszechnego dodawania tego samego składnika do różnych produktów spożywczych, i to często w znacznych ilościach. Hiperalimentacja może być konsekwencją nie tylko stosowania dużych naddatków technologicznych podczas wzbogacania produktów spożywczych (Jantarska i in. 2007), ale także powszechnego indywidualnego przyjmowania suplementów diety. Dotyczy to między innymi witamin z grupy B, których zażywanie wciąż jest uważane za całkowicie bezpieczne i niestwarzające ryzyka hiperalimentacji (Flynn i in. 2003). Dlatego też są one powszechnie dodawane do żywności w celu jej wzbogacenia oraz pojawiają się w różnego rodzaju preparatach farmaceutycznych będących suplementami diety.

Wzrastająca świadomość żywieniowa społeczeństwa sprawia, że wiele osób podejmuje indywidualne próby korekty sposobu żywienia. Zmiany te rzadko polegają na racjonalizacji diety, częściej natomiast jest obserwowana suplementacja diety preparatami witaminowymi i/lub mineralnymi, co jest postrzegane przez konsumentów jako prosta droga do utrzymania zdrowia oraz dobrej kondycji fizycznej i psychicznej.

Prowadzone badania wykazują różną częstość stosowania suplementacji diety w zależności od rejonu, wieku badanych i sposobu zbierania danych, niemniej jednak dotyczy ona

znacznego odsetka populacji. Suplementy diety w postaci preparatów witaminowych i/lub mineralnych przyjmowało od 30% (Kozyrska i in. 2010) do niemal 70% dzieci w wieku szkolnym (Wawrzyniak i in. 2009), przy czym najczęściej suplementami były witaminy z grupy B. Nieco rzadziej suplementy zażywały młode osoby dorosłe. Trafalska i Grzybowski (2009) stwierdzili, że suplementację diety stosowało 30% badanych przez nich studentów. W przypadku osób starszych, po 60. roku życia, suplementy witaminowe i/lub mineralne przyjmowało od 42% (Kałuża i in. 2004) do 65% tej populacji (Saran i Duda 2009), przy czym niemal 40% zażywało suplementy systematycznie w ciągu całego roku.

Decyzja o przyjmowaniu suplementów bardzo rzadko była konsultowana z dietetykiem lub lekarzem. Najczęściej wynikała z przekonania, że witaminy i składniki mineralne mają korzystny wpływ na zdrowie, a codzienna dieta jest w nie uboga. Stwierdzono również, że osoby stosujące suplementację często odżywiały się lepiej niż osoby jej niestosujące – częściej jadały owoce, warzywa, pełnoziarniste przetwory zbożowe, mleko i jego przetwory oraz ryby, natomiast ograniczały w diecie słodycze i produkty typu fast food (Kozioł-Kozakowska i in. 2009, Kozyrska i in. 2010). Ponadto osoby stosujące suplementację częściej świadomie uwzględniały w diecie produkty wzbogacane. Wiele osób przyjmujących suplementy także nieświadomie spożywało produkty wzbogacane (Kozyrska i in. 2010). Zachowania takie prowadzą do przekraczania zalecanej dziennie ilości witamin i stwarzają ryzyko hiperalimentacji. Wawrzyniak i in. (2009), oceniając pobranie witamin z grupy B i witamin antyoksydacyjnych z racją pokarmową i suplementami, stwierdzili niemal trzykrotne przekroczenie dziennego zapotrzebowania na witaminy z grupy B. Stosowana suplementacja często nie przynosiła oczekiwanych rezultatów w postaci uzupełnienia niedoborów składników występujących w diecie w zbyt małych ilościach, zwiększała natomiast nadmiary już istniejące w całodziennej racji pokarmowej (Kolmaga i in. 2009), co dodatkowo prowadziło do dysproporcji pomiędzy spożywanymi składnikami.

Coraz częstsza suplementacja diety witaminami dotyczy nie tylko populacji polskiej. Zjawisko to jest obserwowane niemal na całym świecie i zdecydowanie częściej występuje w krajach rozwiniętych gospodarczo (Harrison i in. 2004, Rock 2007, Murphy i in. 2011).

Powszechnemu stosowaniu suplementacji sprzyja szeroko prowadzona reklama suplementów witaminowych i/lub mineralnych. Reklama jest wykorzystywana w niemal każdej działalności gospodarczej, ale w przemyśle farmaceutycznym nabiera szczególnego znaczenia i rozmiarów. Przynosi bowiem firmom wymierne korzyści, zwiększając popyt na ich produkty, i pozwala na dynamiczny rozwój rynku leków i parafarmaceutyków, którymi są między innymi suplementy diety w postaci preparatów witaminowych i/lub mineralnych. W badaniach przeprowadzonych przez Ulatowską-Szostak (2008) stwierdzono, że niemal co drugi Polak kupujący parafarmaceutyki zrobił to pod wpływem reklamy, która nierzadko kształtuje postawy i potrzeby konsumenta, propagując nowe wartości i styl życia. W społeczeństwie częste jest przekonanie, że istnieje pigułka na każdą dolegliwość, a suplement jest skuteczniejszy niż odpowiednie żywienie i tryb życia. U odbiorców reklam wzbudza się pragnienie i nadzieję bycia zdrowszym, piękniejszym, wiecznie młodym, pełnym sił i energii oraz stwarza się wrażenie, że jest to proste i możliwe, jeśli tylko będzie się przyjmowało dany suplement diety. Dzieje się tak między innymi dlatego, że reklama mająca nakłonić do zakupu nie

zawsze opiera się na rzetelnej informacji o suplemencie, podkreśla jego korzystne aspekty, minimalizując ryzyko związane z przedawkowaniem. Wydaje się, że dla wielu konsumentów suplementy w postaci preparatów witaminowych stały się nieodzownym składnikiem codziennej diety.

Pojawiają się już jednak doniesienia, że powszechnie stosowana suplementacja nie jest właściwą drogą do zachowania zdrowia. Jako pierwsze pojawiły się zastrzeżenia dotyczące podawania w formie suplementów diety witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, przede wszystkim witaminy A i E. W wielu badaniach wykazano, że odpowiednie spożycie witamin antyoksydacyjnych z żywnością oraz ich prawidłowe stężenie w surowicy krwi wiąże się z mniejszym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca oraz chroni przed procesami nowotworzenia (Zino i in. 1997, Broekmans i in. 2000, John i in. 2002, Brunner i in. 2007). Obserwacje te stały się podstawą do przeprowadzenia prób klinicznych stosowania syntetycznej witaminy E we wtórnej prewencji miażdżycy. Jednak przyjmowanie witaminy E w formie preparatów farmaceutycznych nie było korzystne w profilaktyce choroby niedokrwiennej serca (Stephens i in. 1996, Rapola i in. 1997, Leppala i in. 2000). Stwierdzono, że dostarczenie wyizolowanego składnika diety, którym był α-tokoferol, zaburzało metabolizm lipoprotein osocza krwi, prowadziło do peroksydacji lipidów błonowych oraz nasilało zmiany miażdżycowe. W warunkach eksperymentalnych antyoksydacyjny α-tokoferol stał się prooksydantem. W warunkach fizjologicznych α-tokoferol przerywa łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów, reagując zarówno z wolnymi rodnikami nadtlenków lipidowych, jak i wolnymi rodnikami fazy wodnej. Powoduje on sparowanie elektronów w wolnym rodniku, tworząc wolny rodnik tokoferolksylowy, który działa jako propagator peroksydacji błon biologicznych i lipoprotein osocza do momentu zneutralizowania przez koantyoksydanty. Dlatego podanie izolowanego α-tokoferolu, bez koantyoksydantów, nasilało reakcje utleniania.

Niekorzystne efekty suplementacji obserwowano także podczas stosowania większych dawek β-karotenu u palaczy, u których zwiększał on ryzyko zachorowania na nowotwór płuc (The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group 1994, Albanes i in. 1996). Obserwowane efekty mogły być spowodowane niezbilansowaniem diety pod względem zawartości β-karotenu i witaminy E. Przy niedoborze witaminy E β-karoten stosowany w wysokich dawkach jest atakowany przez rodniki alkoksylowe, które powodują jego niesymetryczny rozpad z wytworzeniem dużych ilości β-apo-karotenoidów. Gromadzące się w komórkach β-apo-karotenoidy indukują specyficzne izoformy cytochromu P-450, które przekształcają prokancerogeny obecne w dymie papierosowym w kancerogeny ostateczne, zwiększając tym samym progresję nowotworów płuc u palaczy tytoniu (Omenn i in. 1996). Badania te przyczyniły się do weryfikacji poglądów na temat bezpieczeństwa stosowania suplementów witaminy E i β-karotenu. Wykazały także, że rola witamin jest wzajemnie zależna i nadmiar lub niedobór jednej z nich może mieć istotny wpływ na metabolizm i działanie innych.

W 2006 roku naukowcy z Uniwersytetu Hopkinsa opublikowali raport, będący podsumowaniem przeglądu literatury zawierającej wyniki wielu badań dotyczących wpływu suplementacji preparatami witaminowymi i/lub mineralnymi na stan zdrowia (Huang i in. 2006). Z raportu tego wynika, że stosowanie suplementów diety nie zmniejszało, niezależnie od

wieku, płci, statusu i pochodzenia badanych, ryzyka zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory, osteoporozę, kataraktę, zwyrodnienie plamki żółtej i nie poprawiało funkcji poznawczych. Korzystne efekty suplementacji obserwowano tylko u nielicznych osób ze znacznym niedożywieniem.

Potwierdzeniem wyników przeprowadzonej analizy były efekty 11-letnich badań oceny stanu zdrowia i zwyczajów żywieniowych 82 tys. mężczyzn i 100 tys. kobiet w wieku około 60 lat, wykonane i opublikowane przez zespół naukowców z Brigham and Women's Hospital (Park i in. 2011). Badając przyczyny zgonów, naukowcy nie znaleźli żadnej różnicy pomiędzy osobami przyjmującymi preparaty witaminowe i/lub mineralne a tymi, które suplementów nie przyjmowały. W obydwu grupach śmiertelność w wyniku chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów czy chorób przewlekłych była bardzo zbliżona. Na tej podstawie zespół amerykański uznał, że przyjmowanie witamin i/lub składników mineralnych w formie suplementów diety nie przynosi wymiernych korzyści.

Część wyników badań sugeruje jednak, że suplementacja jest korzystna i ogranicza ryzyko wybranych schorzeń (Nijjar i in. 2010). Być może przyjmowanie konkretnych witamin/składników mineralnych ogranicza ryzyko zachorowania z powodu niedoborów pokarmowych u osób gorzej odżywionych, stosujących dietę zbyt ubogą w wybrane składniki lub mających zaburzenia trawienia, wchłaniania i/lub metabolizmu składników odżywczych.

Cytowane wyniki uzyskane w badaniach epidemiologicznych stanowiły asumpt do podjęcia w Zakładzie Fizjologii Żywienia Człowieka Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie badań eksperymentalnych na zwierzętach, dotyczących wpływu na organizm zmiany składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B, które jako rozpuszczalne w wodzie i łatwo wydalane z moczem, są uważane za bezpieczne. Badania te wykazały jednak, że suplementacja witaminami z grupy B diety, w której zastosowano jako zamienniki składników całościowych – pełnych ziaren zbóż – cukry proste i węglowodany rafinowane, nie tylko nie niwelowała niekorzystnych efektów metabolicznych wywołanych zmianą składu diety, ale często je nasilała, prowadząc do zaburzeń gospodarki węglowodanowo-lipidowej. W surowicy krwi zwierząt karmionych paszą suplementowaną stwierdzono bowiem wzrost stężenia pre-β-lipoprotein, β-lipoprotein, triacylogliceroli oraz cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL (Friedrich i Goluch-Koniuszy 2007, 2009, Friedrich i Sadowska 2008, Goluch-Koniuszy i Wierzbicka 2011). Stwierdzono także, że suplementacja przyczyniała się do gromadzenia tkanki tłuszczowej okołosercowej i tłuszczu krezkowego oraz wzrostu ilości tłuszczu w wątrobie i mięśniach (Friedrich i Sadowska 2005a, b, 2008).

Wiadomo już, że nadmierna ilość tkanki tłuszczowej wywiera wielokierunkowe niekorzystne efekty zdrowotne. Zbyt duża masa ciała nadmiernie obciąża stawy, może prowadzić do zaburzeń oddychania i w konsekwencji do niedotlenienia tkanek, zmniejsza także zdolność do wysiłku fizycznego (Shah i Roux 2009, Runhaar i in. 2011). Stwierdzono ponadto, że otyłość androidalna, cechująca się nagromadzeniem tkanki tłuszczowej wewnątrz jamy brzusznej, jest dodatnio skorelowana ze stężeniem triacylogliceroli, cholesterolu całkowitego i lipidów całkowitych w surowicy krwi. Obserwowane zaburzenia lipidowe są jedną z przyczyn częstszego występowania w tej grupie osób hiperinsulinemii, cukrzycy typu II, choroby

niedokrwiennej serca oraz nadciśnienia tętniczego (Despres 2006, Lavie i in. 2009, Zalesin i in. 2011). Udowodniono, że również ilość tkanki tłuszczowej okołosercowej jest dodatnio skorelowana z występowaniem choroby niedokrwiennej serca (Ding i in. 2009).

Poza magazynowaniem substratów energetycznych w postaci triacylogliceroli tkanka tłuszczowa pełni wiele funkcji. Obecnie szczególnie podkreśla się jej funkcję wydzielniczą (Galic i in. 2010). Tkanka tłuszczowa jest bowiem miejscem biosyntezy wielu aktywnych biologicznie związków, które po wydzieleniu przez adipocyty działają poza jej obrębem. Za ich pośrednictwem tkanka tłuszczowa komunikuje się z innymi tkankami i narządami, a zmiany jej metabolizmu, ilości i lokalizacji znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach metabolicznych całego organizmu. Do związków aktywnie produkowanych i wydzielanych przez tkankę tłuszczową należą między innymi czynnik martwicy nowotworu α (TNF-α) oraz interleukiny 6 (IL-6) i 11 (IL-11) – Hotamisligil i in. 1993, Fried i in. 1998. Ilość wewnątrzbrzusznej tkanki tłuszczowej jest także skorelowana między innymi ze wzrostem stężenia glikokortykosteroidów we krwi (Wallerius i in. 2003). Zarówno glikokortykosteroidy, jak i interleukina 6 oraz czynnik martwicy nowotworu α wpływają na metabolizm kości, prowadząc do ich zwiększonej resorpcji (Boyce i in. 2005, Fuller i in. 2007).

Jednak niewielka nadwaga jest często postrzegana jako czynnik ochronny w rozwoju osteoporozy ze względu na dużą aktywność aromatazy w tkance tłuszczowej podskórnej. Aromataza ukierunkowuje przemiany hormonów płciowych w estrogeny, działające na kość zarówno bezpośrednio (wykazano obecność receptorów 17-β estradiolu w kościach), jak i pośrednio (przez wpływ na syntezę i aktywność hormonów kalciotropowych) – Hoyland i in. 1997, Riggs 2000. Tkanka tłuszczowa przejmuje więc częściowo rolę gruczołu dokrewnego i dlatego obwodowa produkcja estrogenów jest większa u osób otyłych. Wykazano procentowy wzrost przemiany androstendionu w estron z 1–2% u kobiet z prawidłową masą ciała do 12–15% u kobiet otyłych. Konwersja ta jest jednak związana z rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej i dlatego nie wszystkie wyniki badań potwierdzają związek pomiędzy ilością tkanki tłuszczowej a gęstością mineralną kości (Chen i in. 2002, Bener i in. 2005).

Wykazano, że do czynników zmieniających metabolizm kostny należą także leptyna, adiponektyna i rezystyna produkowane w tkance tłuszczowej. Wpływ leptyny wydzielanej przez adipocyty na metabolizm kości jest niejednoznaczny, gdyż uzyskano zarówno dodatnie, jak i ujemne korelacje pomiędzy stężeniem leptyny a gęstością mineralną kości (Pasco i in. 2001, Morberg i in. 2003, Kontogianni i in. 2004). Adiponektyna, której stężenie jest ujemnie skorelowane z masą ciała, hamuje różnicowanie osteoklastów i aktywuje powstawanie osteoblastów, przyczyniając się w ten sposób do zwiększenia masy tkanki kostnej (Berner i in. 2004, Jurimae i in. 2005). Rezystyna, której stężenie jest wprost proporcjonalne do masy ciała, aktywuje zarówno proliferację osteoblastów, jak i różnicowanie osteoklastów, wpływając na przebudowę kości (Thommesen i in. 2006). Niemniej jednak stwierdzono odwrotną korelację pomiędzy stężeniem rezystyny a gęstością mineralną tkanki kostnej (Oh i in. 2005).

Tkanka tłuszczowa jest więc miejscem biosyntezy wielu składników lub wpływa na syntezę składników w różny sposób modyfikujących metabolizm kości. Powstaje więc pytanie, jaka jest wypadkowa ich działania na procesy resorpcji i kościotworzenia? Czy nie stwarzają one ryzyka rozwoju osteoporozy, która na całym świecie stanowi coraz większy pro-

blem zdrowotny? W ostatnich latach Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła osteoporozę do głównych chorób cywilizacyjnych (Cole i in. 2008). Wśród przyczyn zgonów zajmuje trzecie miejsce – po chorobach układu krążenia i nowotworach. W 2000 roku na całym świecie zarejestrowano około 9 mln złamań osteoporotycznych, w tym 1,6 mln złamań bliższego końca kości udowej, 1,7 mln złamań przedramienia i 1,4 mln złamań kręgów. Analiza uwzględniająca podział na regiony świata wykazała, że największa liczba złamań osteoporotycznych występuje w Europie, dla której wskaźnik DALY (ang. *Disability-Adjusted Life Years*), oznaczający utratę jednego roku życia w pełnym zdrowiu w wyniku zarówno przedwczesnego zgonu, jak też niepełnosprawności spowodowanej przez chorobę (Murray i in. 2002), był większy w przypadku tych złamań niż w przypadku takich nowotworów, jak rak sutka, jelita grubego, żołądka i prostaty (Johnell i Kanis 2006). Osoby, które przeżywają, przeważnie cierpią fizycznie z powodu bólu i psychicznie ze względu na ograniczenia ruchowe. Osteoporoza pogarsza jakość życia, a jedna trzecia osób, u których wystąpiło złamanie kości, nigdy nie powraca do pełnej samodzielności i wymaga długotrwałej opieki. Wzrost zachorowań na osteoporozę obserwowany w wielu krajach powoduje konieczność znacznego zwiększania nakładów finansowych na służbę zdrowia (Johnell i Kanis 2004).

Częstość występowania osteoporozy w populacji wzrasta z wiekiem, a problemy z nią związane rosną wraz z długością życia. Rozwój medycyny prewencyjnej oraz diagnostyki i terapii powoduje stopniowe zwiększanie średniej długości życia. Skutkiem tego jest zmiana struktury demograficznej, powodująca stały wzrost odsetka osób w wieku starszym (Nowak 1995, Rządowa Rada Ludnościowa 2004). W związku z tym problem osteoporozy będzie narastał. Można też przypuszczać, że schorzenie to będzie występowało u coraz młodszych osób ze względu na uwarunkowania żywieniowe i ograniczoną aktywność fizyczną obecnych pokoleń. Z danych epidemiologicznych wynika, że obecnie w Polsce ponad 25% populacji po 50. roku życia jest zagrożone złamaniami osteoporotycznymi (Marcinowska-Suchowierska 2002, Czerwinski i in. 2009). Przy założeniu, że liczebność populacji ludzi starszych nadal będzie wzrastać, a niewłaściwy tryb życia i odżywiania będzie się utrzymywać, liczba złamań osteoporotycznych będzie również wzrastać. Przewiduje się, że liczba złamań i koszty z nimi związane zwiększą się ponaddwukrotnie w ciągu kilku następnych dziesięcioleci. Skłania to do spojrzenia na profilaktykę i wczesne wykrywanie choroby jako postępowanie jak najbardziej opłacalne.

Kość jest szczególnym rodzajem tkanki łącznej, zbudowanej z macierzy kolagenowej wysyconej solami mineralnymi, głównie fosforanami wapnia. Jest to tkanka żywa. Dzięki obecności aktywnych osteoblastów i osteoklastów dynamicznie przebudowuje się przez całe życie. U osobników dorosłych komórki te biorą udział głównie w procesach przebudowy tkanki kostnej, czyli jej resorpcji i tworzeniu *de novo*. Osteoblasty pochodzą z prekursorów komórek podścieliska szpiku kostnego i są komórkami odpowiedzialnymi za wytwarzanie białkowej macierzy kostnej. Różnicowanie się komórek podścieliska szpiku w kierunku preosteoblastów jest pobudzane między innymi przez hormony tarczycy, hormon wzrostu, interleukinę 3 (IL-3) i 1 (IL-1) i inne czynniki wzrostowe (Dodds i in. 1994), natomiast w hamowanie tego procesu są zaangażowane między innymi glikokortykosteroidy. Komórkami odpowiedzialnymi za proces resorpcji kości są osteoklasty. Prekursory osteoklastów wywodzą się

z kolonii komórek dających początek linii granulocytów obojętnochłonnych i monocytów. Ich różnicowanie się w kierunku osteoklastów zachodzi pod wpływem interleukiny 1 (IL-1), 6 (IL-6) i 11 (IL-11) oraz czynnika martwicy nowotworu α (TNF-α) – Kobayashi i in. 2000.

Dojrzała, zmineralizowana kość składa się głównie z fosforanu wapnia i podłoża organicznego, które w przeważającej części stanowi kolagen. W macierzy kostnej wapń tworzy z fosforanem krystaliczną strukturę hydroksyapatytu. Jego metabolizm zachodzi wewnątrz kości z udziałem osteoklastów, które rozkładają hydroksyapatyt i uwalniają wapń oraz fosforany w postaci zjonizowanej do płynu międzykomórkowego. W ciągu całego życia kość jest stale resorbowana i na nowo tworzona. Odtwarzanie kości jest procesem miejscowym. Odbywa się na małych obszarach zwanych punktami kostnienia, w których osteoklasty najpierw „trawią" tkankę kostną, a następnie osteoblasty odkładają w tym samym miejscu nową kość. Od równowagi pomiędzy tymi dwoma procesami zależy, czy zostanie utrzymana stała masa kostna. Zachwianie równowagi na korzyść resorpcji zmniejsza masę kostną i przyczynia się do rozwoju osteoporozy. Istnieje bardzo wiele czynników mogących wywoływać zaburzenia metabolizmu kostnego. Rozwój osteoporozy jest uwarunkowany genetycznie, środowiskowo (stosowanie używek, krótki czas ekspozycji na światło słoneczne), hormonalnie (późne lub przedwczesne pokwitanie, brak ciąży i porodu u kobiet) oraz żywieniowo (Dontas i Yiannakopoulos 2007). Wiele danych wskazuje, że przez odpowiednią modyfikację diety można zmniejszyć ryzyko pojawienia się osteoporozy (Prentice 2004). Dietoprofilaktyka osteoporozy polega głównie na spożywaniu odpowiednich ilości wapnia i witaminy D z dietą. Ważna jest także odpowiednia ilość białka, fosforu, sodu i witamin C, A i B_6 oraz składników mineralnych – magnezu, cynku, manganu i miedzi.

W prowadzonych wcześniej badaniach własnych stwierdzono, że zastosowana suplementacja diety witaminami z grupy B zmniejszała ilość paszy spożywanej przez zwierzęta, zmniejszając w konsekwencji pobieranie niezbędnych składników diety, w tym wapnia, magnezu i innych składników biorących udział w procesach kościotworzenia (Friedrich i in. 2002, Friedrich i Sadowska 2005a). Badania wykazały także, że mniejszemu spożyciu paszy towarzyszyły zmniejszone przyrosty masy ciała badanych zwierząt, nieadekwatne do wartości energetycznej pobranej paszy (Sadowska 2002). U zwierząt żywionych paszą suplementowaną, pomimo mniejszych przyrostów masy ciała, stwierdzono jednak większe gromadzenie tkanki tłuszczowej okołosercowej i tłuszczu krezkowego oraz wzrost zawartości tłuszczu w mięśniach szkieletowych (Friedrich i Sadowska 2005a).

Wiele badań epidemiologicznych wskazuje na związek pomiędzy gromadzeniem tkanki tłuszczowej a wielkością spożycia wapnia z dietą. Po raz pierwszy zależność taką zaobserwowali McCarron i in. (1984) w badaniach NHANES-I (National Health and Nutrition Examination Survey). Podobne obserwacje opisali Carruth i in. (1999), Skinner i in. (1999) oraz Teegarden i in. (1999). Ponieważ nie było jednak podstaw do wytłumaczenia obserwowanych zależności, zostały one pominięte we wnioskowaniu, a informacje podano tylko w formie opisowej.

Wytłumaczenie obserwowanego związku pomiędzy spożyciem wapnia a masą ciała i gromadzeniem tkanki tłuszczowej stało się możliwe dzięki badaniom Zemela i in. (2000), dotyczącym regulacji i roli wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Badając in vitro oddzia-

ływanie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu na izolowane adipocyty ludzkie, autorzy ci stwierdzili istotny jego wpływ na wzrost dokomórkowego transportu wapnia. Pierwiastek ten w komórkach tłuszczowych nasilał syntezę i zwiększał aktywność syntazy kwasów tłuszczowych, stymulującej lipogenezę. Jednocześnie były hamowane procesy lipolizy. Obserwacje te zostały potwierdzone w prowadzonym równocześnie badaniu in vivo z udziałem myszy, które żywiono czterema dietami o zróżnicowanej zawartości wapnia, będącej bezpośrednim czynnikiem warunkującym tempo syntezy 1,25-dihydroksycholekalcyferolu. Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że większa zawartość wapnia w diecie zmniejszała ilość wewnątrzbrzusznej, okołonerkowej, podłopatkowej i podskórnej tkanki tłuszczowej (Zemel i in. 2000).

Metabolizm wapnia jest ściśle związany z metabolizmem magnezu, który jest jego naturalnym antagonistą. Pierwiastki te współzawodniczą ze sobą podczas wchłaniania w jelicie cienkim, a także w nerce o wspólne miejsca reabsorpcji w pętli Henlego. W organizmie magnez pozostaje w dynamicznej równowadze z wapniem i częściowo warunkuje jego prawidłowy metabolizm. Odpowiada za wbudowywanie wapnia w tkankę kostną, aktywuje proces kostnienia przez pobudzenie aktywności enzymów, które uczestniczą w budowie kości, stymuluje komórki kościotwórcze do wbudowywania wapnia w strukturę kośćca, wpływa na transformację witaminy D w formę aktywną, stymuluje kalcytoninę (hormon pobudzający odkładanie wapnia w kościach), reguluje także transport wapnia i zapobiega niefizjologicznemu odkładaniu się tego pierwiastka w tkankach miękkich (Nielsen 2006).

Podstawą do podjęcia eksperymentu stały się wyniki uzyskane we wcześniejszych badaniach własnych, w których stwierdzono wpływ suplementacji diety witaminami z grupy B, mogący zmieniać gospodarkę wapniem w ustroju. W badaniach tych zaobserwowano, że zwierzęta żywione paszą suplementowaną charakteryzowały się:

– mniejszym spożyciem paszy, w tym wapnia i magnezu;

– mniejszymi przyrostami masy ciała, nieadekwatnymi do wartości energetycznej pobranej paszy;

– wzrostem akumulacji okołonarządowej tkanki tłuszczowej, która wydziela czynniki o działaniu nasilającym resorpcję kości.

Postawiono więc hipotezę, że suplementacja diety witaminami z grupy B, przez wpływ na określone tory metaboliczne i parametry krwi, może istotnie oddziaływać na gospodarkę wapniem i magnezem pozostającym z nim w dynamicznej równowadze w ustroju, prowadząc między innymi do zmniejszenia ilości tych pierwiastków w kościach, a tym samym predysponując zwierzęta do rozwoju osteoporozy.

2. Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu zmiany składu diety (zastąpienie części pełnych ziaren pszenicy i kukurydzy mąką pszenną i sacharozą) oraz jej suplementacji witaminami z grupy B na gospodarkę wapniem i magnezem pozostającym z nim w dynamicznej równowadze w ustroju.

Cel postanowiono osiągnąć, analizując u zwierząt modelowych:

– ilość pobieranej paszy, wapnia i magnezu;

– przyrosty masy ciała;

– ilość tłuszczu krezkowego;

– stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu krwi;

– całkowite stężenie wapnia i magnezu w osoczu i w pełnej krwi;

– zawartość wapnia i magnezu w wybranych tkankach (mięsień udowy, mięsień sercowy, wątroba, kość udowa);

– dobowe wydalanie wapnia i magnezu w moczu;

– aktywność fosfatazy zasadowej oraz stężenia hormonów biorących udział w gospodarce wapniowej – 1,25-dihydroksycholekalcyferolu ($1,25(OH)_2D_3$) i parathormonu (PTH).

3. Materiał i metody badań

Doświadczenie przeprowadzono, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Szczecinie (nr zgody 3/2006), w wiwarium Zakładu Fizjologii Żywienia Człowieka Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie na 42 samcach szczura szczepu Wistar SPRD, w wieku sześciu–ośmiu miesięcy, o wyjściowej masie ciała 423 ± 19,4 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli Zwierzętarni Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wybór szczepu był podyktowany możliwością jego wykorzystania do badań żywieniowych, fizjologicznych i biochemicznych. Transport zwierząt oraz warunki bytowania były zgodne z Ustawą z dnia 21 sierpnia 1997 r., o ochronie zwierząt, z uwzględnieniem późniejszych zmian (DzU z 1997 r., nr 111, poz. 724).

Zwierzęta, po uprzednim tygodniowym kondycjonowaniu w warunkach wiwarium (temperatura 21–22ºC, wilgotność względna powietrza 55–60%, cykl jasność/ciemność 12/12 h), podzielono na trzy równoliczne grupy (n = 14). Kryterium podziału zwierząt była ich masa ciała – podzielono je tak, aby średnia masa ciała w poszczególnych grupach była zbliżona (w I grupie wynosiła 425 g ± 33,2 g; w II grupie – 422 g ± 34,0 g; w III grupie – 419 g ± 29,9 g).

Szczury żywiono granulowanymi mieszankami wyprodukowanymi z tych samych komponentów (oprócz składników różnicujących – mąki pszennej i sacharozy) przez Wytwórnię Pasz i Koncentratów w Kcyni. Pasze wyprodukowano na oddzielnej linii produkcyjnej przeznaczonej do wytwarzania pasz według indywidualnych receptur, na specjalne zamówienie. Przed produkcją zastosowano procedurę 5.14.5. „Czyszczenie maszyn i urządzeń". I grupa była żywiona paszą podstawową (Labofeed B), II i III grupa – paszą zmodyfikowaną, w której 83,5% pszenicy obecnej w paszy podstawowej zastąpiono mąką pszenną niewzbogacaną (typ 500), a 50% kukurydzy – sacharozą. Udział pozostałych składników w paszach był identyczny (tabela 1).

Pasza Labofeed B odpowiadała wymaganiom stawianym paszy AIN-93 (Reeves i in. 1993), która jest standardowo stosowana w żywieniu szczurów laboratoryjnych. Recepturę paszy Labofeed B opracowano, opierając się na wymaganiach międzynarodowych norm w zakresie żywienia zwierząt laboratoryjnych oraz badaniach prowadzonych w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie. Zamiana składników paszy podczas zestawiania składu paszy zmodyfikowanej miała na celu, do pewnego stopnia, odwzorowanie błędów żywieniowych obserwowanych współcześnie, tj. wzrostu udziału sacharozy w wartości energetycznej racji pokarmowej oraz obecności większej ilości węglowodanów rafinowanych w diecie.

Tabela 1. Skład surowcowy pasz zastosowanych w doświadczeniu (g/100 g)

Nazwa komponentu	Pasza podstawowa	Pasza zmodyfikowana
Pszenica	36,4	6
Kukurydza	20	10
Otręby pszenne	20	20
Serwatka suszona	3	3
Sól pastewna[1]	0,3	0,3
Śruta sojowa 48%	17	17
Kreda pastewna[2]	1,5	1,5
Fosforan 2-CA[3]	0,8	0,8
Premiks LRM[4]	1	1
Mąka pszenna	–	30,4
Sacharoza	–	10

[1] Głównie NaCl.
[2] Głównie $CaCO_3$.
[3] $CaHPO_4$.
[4] Preparat witaminowo-mineralny stosowany w paszach dla zwierząt.

Aby ustalić skład chemiczny pasz, przeprowadzono podstawowe analizy chemiczne. Próbki pierwotne, o masie 500 g, pobrano z wszystkich worków danej paszy, uwzględniając górę, środek i spód worka. Tak pobrane próbki zhomogenizowano i pobrano z nich naważki do oznaczeń wykonanych w czterech powtórzeniach dla każdej próbki. Zawartość poszczególnych składników dla każdej paszy wyliczono jako wartość średnią ze średniej uzyskanej z czterech powtórzeń dla każdej z trzech pobranych próbek. Wartość tak wyliczona była reprezentatywna dla całej partii paszy.

W próbkach oznaczono zawartość: azotu ogólnego, który przeliczono na ilość białka (PN-75/A-04018), tłuszczu surowego (PN-ISO 6492:2005), suchej masy (PN-ISO 1442:2000) i popiołu (PN-ISO 2171:1994). Zawartość węglowodanów wyliczono z różnicy pomiędzy suchą masą a sumą pozostałych składników stałych. W paszach zastosowanych w doświadczeniu określono również zawartość nierozpuszczalnych frakcji błonnika pokarmowego (tabela 2). Oznaczenia wykonano metodą Van Soesta i Wine'a (1967) na aparacie ANKOM 220 (PN-ISO 5498:1996). Korzystając z uzyskanych wyników, obliczono ilość energii brutto pasz, stosując równoważniki fizyczne wynoszące dla białka ogólnego – 5,65 kcal/g (23,6 kJ/g), dla tłuszczu – 9,45 kcal/g (39,6 kJ/g) i dla węglowodanów – 4,15 kcal/g (17,4 kJ/g). Wyliczono też całkowitą wartość energetyczną pasz (energię metaboliczną), przyjmując równoważniki energetyczne Atwatera netto: dla białka – 4,0 kcal/g (16,76 kJ/g), dla tłuszczu – 9,0 kcal/g (37,71 kJ/g) oraz dla węglowodanów – 4,0 kcal/g (16,76 kJ/g) – tabela 2.

Tabela 2. Skład chemiczny pasz zastosowanych w doświadczeniu

Składnik	Pasza podstawowa	Pasza zmodyfikowana
Białko ogólne (g/100 g)	20,3	18,6
Tłuszcz surowy (g/100 g)	2,61	3,02
Węglowodany (g/100 g)	62,5	64,2
Sucha masa (g/100 g)	91,3	91,3
Popiół ogólny (g/100 g)	5,91	5,43
Błonnik pokarmowy (% s.m.)		
Celuloza	6,09	5,67
Hemiceluloza	10,31	5,69
Lignina	1,42	1,31
Energia brutto		
kcal/g	3,99	4,0
kJ/g	16,7	16,7
Energia metaboliczna		
kcal/g	3,55	3,56
kJ/g	14,8	15,0

W próbkach pasz pobranych według wcześniejszego opisu oznaczono także zawartości wybranych witamin z grupy B: tiaminy, ryboflawiny, pirydoksyny. Oznaczenia zawartości witamin wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii gazowej w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie (Oddział Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych w Poznaniu). Zawartość kwasu nikotynowego wyliczono, biorąc pod uwagę jego zawartość w poszczególnych komponentach paszy. W próbkach pasz oznaczono również, metodą spektrometrii emisyjnej, z użyciem aparatu „Optima 2000 DV" produkcji firmy Perkin Elmer, zawartość wapnia i magnezu. Wyniki oznaczeń zamieszczono w tabeli 3.

Tabela 3. Zawartość wybranych witamin z grupy B oraz wapnia i magnezu w paszach zastosowanych w doświadczeniu (mg/100 g)

Składnik	Pasza podstawowa	Pasza zmodyfikowana
Tiamina	0,225	0,092
Ryboflawina	0,080	0,042
Pirydoksyna	0,156	0,050
Kwas nikotynowy	1,684	0,562
Wapń	1110	1090
Magnez	320	287

Zwierzęta żywiono *ad libitum*. Zważone pasze podawano ręcznie do karmników, do których szczury miały wolny dostęp. Ilość rzeczywiście spożytej paszy obliczano przez odjęcie od masy paszy zadanej masy niewyjadów (pasza, która została w karmniku, oraz ta, która spadła na dno klatki).

Zwierzęta I i II grupy otrzymywały do picia czystą, odstałą wodę wodociągową, zwierzęta III grupy – wodny roztwór witamin z grupy B (B_1, B_2, B_6 i PP), pochodzących z ogólnie dostępnych preparatów farmaceutycznych. Suplementowane witaminy podawano w ilości: 9,23 mg tiaminy, 34,6 mg ryboflawiny, 23,1 mg pirydoksyny i 37,5 mg amidu kwasu nikotynowego w przeliczeniu na 1 kg paszy. Zastosowana dawka imitowała do pewnego stopnia wielkość suplementacji zalecaną do stosowania przez ludzi w stosunku do ich zapotrzebowania na poszczególne witaminy, z uwzględnieniem różnic w zapotrzebowaniu pomiędzy ludźmi i badanymi zwierzętami laboratoryjnymi (*Nutrient requirements.*… 1995). Zwierzętom podawano roztwór witamin, a następnie dopajano je odstałą wodą wodociągową.

W wodzie podawanej zwierzętom oraz roztworach witamin raz w tygodniu oznaczano zawartość wapnia i magnezu (metodą spektrofotometryczną). Średnia zawartość tych pierwiastków w wodzie podawanej zwierzętom w czasie doświadczenia wynosiła 71,8 ± 1,57 mg/l wapnia i 16,5 ± 1,18 mg/l magnezu, w roztworach witamin zawartość wapnia wynosiła 72,3 ± 1,41 mg/l, zawartość magnezu – 17,1 ± 1,53 mg/l.

Doświadczenie trwało siedem tygodni, w trakcie których codziennie kontrolowano ilość paszy spożywanej przez zwierzęta i wypijanych płynów, a raz w tygodniu – masę ciała zwierząt. Na początku doświadczenia szczury ważono z dokładnością do 1 g na wadze WLC 6/A2 firmy Radwag, a następnie w tygodniowych odstępach w trakcie jego trwania. Całkowity przyrost masy ciała wyliczono z różnicy pomiędzy końcową a początkową masą ciała.

W szóstym tygodniu doświadczenia zwierzęta umieszczono w klatkach metabolicznych firmy Tecniplast i po 48 godzinach kondycjonowania przeprowadzano 24-godzinną zbiórkę moczu, w którym oznaczono stężenie kreatyniny (metodą spektrofotometryczną kinetyczną) oraz wapnia i magnezu (metodą spektrofotometryczną).

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta uśpiono anestetykiem Ketanest (Pfizer Ireland Pharmaceuticals) podanym domięśniowo w dawce 10 mg/kg masy ciała i pobrano krew z serca. Krew pobrano do probówek polipropylenowych na tzw. skrzep oraz do probówek z antykoagulantem (heparyna). Sporządzono także hemolizaty krwi, które uzyskano przez dodanie do 1 ml pełnej krwi heparynizowanej 9 ml wody dejonizowanej.

We krwi oznaczono wartość wskaźnika hematokrytowego, odwirowując ją przez 5 min przy prędkości 6000 obr./min w kapilarach umieszczanych w wirówce hematokrytowej MPW-52.

Pozostałą krew wirowano przez 20 min w temperaturze 4ºC, przy 3500 $U*min^{-1}$ w wirówce MPW-350R, uzyskując surowicę i osocze. W otrzymanej surowicy krwi oznaczono stężenie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu i parathormonu metodą immunoenzymatyczną na aparacie firmy Bio Tek. Użyto odczynników firm Cusabio Biotech (Rat 1,25-Dihydroksywitamin D_3 Elisa kit, nr kat. CSB-E 13342r) oraz Immutopics (Rat Intact PTH Elisa kit, nr kat. 60-2500) zgodnie z metodykami załączonymi do zestawów.

W uzyskanym osoczu i hemolizacie krwi oznaczono stężenia wapnia i magnezu (metodą spektrofotometryczną). Koncentrację wapnia i magnezu w krwinkach czerwonych oznaczono metodą pośrednią, opartą na prawie stężeń i wymagającą określenia wartości wskaźnika hematokrytu oraz stężeń wapnia i magnezu w osoczu i pełnej krwi ze wzoru (Basso i in. 2000, Wieleba i in. 2001, Kozielec i in. 2006):

$$Mg/Ca_{ER} = \{Mg/Ca_{PK} - [Ca/Mg_{OS} \bullet (1 - HCT)]\} / HCT$$

gdzie:

Mg/Ca_{ER} – stężenie wapnia/magnezu w erytrocytach (mmol/l),
Mg/Ca_{PK} – stężenie wapnia/magnezu w pełnej krwi (mmol/l),
Ca/Mg_{OS} – stężenie wapnia/magnezu w osoczu (mmol/l),
HCT – hematokryt.

W osoczu krwi oznaczono także stężenie albumin (metodą spektrofotometryczną), aktywność fosfatazy zasadowej (metodą spektrofotometryczną kinetyczną) oraz stężenie wapnia zjonizowanego (z użyciem elektrody jonoselektywnej). Ponieważ aktywność całkowita fosfatazy zasadowej w surowicy krwi jest sumą aktywności mieszaniny izoenzymów pochodzących głównie z kości i wątroby, a podwyższona aktywność tej formy jest obserwowana przy nasilonej przebudowie kostnej lub w schorzeniach wątroby, w osoczu krwi oznaczono także aktywność γ-glutamylotranspeptydazy (metodą spektrofotometryczną kinetyczną), której wzrost towarzyszy wzrostowi aktywności fosfatazy zasadowej w schorzeniach wątroby i która może być czynnikiem różnicującym pochodzenie fosfatazy zasadowej w osoczu krwi (Zilva i Pannall 1979).

Wszystkie oznaczenia spektrofotometryczne (w moczu, hemolizatach, osoczu i surowicy krwi) wykonano w trzech powtórzeniach, z użyciem odczynników firmy BioMaxima. Stosowano następujące metodyki:

– stężenie albuminy – metodą punktu końcowego z zielenią bromokrezolową w środowisku kwaśnym, w spektrofotometrze Metertech UV-VIS SP 8001 (Rodkey 1965);

– aktywność fosfatazy zasadowej – metodą kinetyczną z p-nitrofenylofosforanem w środowisku zasadowym, w spektrofotometrze Marcel Media Bio (IFCC 1983);

– aktywność γ-glutamylotranspeptydazy – metodą kinetyczną z L-γ-glutamylo-3-karboksy-4-nitroanilidem w spektrofotometrze Marcel Media Bio (IFCC 2002);

– stężenie kreatyniny – metodą kinetyczną z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, w spektrofotometrze Marcel Media Bio (Larsen 1972);

– stężenie magnezu – metodą punktu końcowego z błękitem ksylidylowym w środowisku alkalicznym, w spektrofotometrze Metertech UV-VIS SP 8001 (Saris i in. 2000);

– stężenie wapnia – metodą punktu końcowego z o-krezoloftaleiną w środowisku alkalicznym, w spektrofotometrze Metertech UV-VIS SP 8001 (Tietz 1999).

Ponieważ stężenie wapnia i magnezu w osoczu krwi zależy między innymi od ilości białek transportowych należących do frakcji albumin, po wykonaniu oznaczeń wyliczono skorygowane stężenie wapnia i magnezu w osoczu, uwzględniając stężenie albumin. Wykorzystano wzór (Dembińska-Kieć i Naskalski 1998):

$$Ca_{SKOR} = Ca + 0{,}02 \cdot (40 - \text{albuminy})$$

gdzie:

Ca_{SKOR} – stężenie wapnia skorygowanego w osoczu (mmol/l),
Ca – stężenie wapnia w osoczu (mmol/l),
albuminy – stężenie albumin w osoczu (g/l),

oraz wzór (Kokot 2005):

$$Mg_{SKOR} = Mg + 0{,}005 \bullet (40 - albuminy)$$

gdzie:

Mg_{SKOR} – stężenie magnezu skorygowanego w osoczu (mmol/l),
Mg – stężenie magnezu w osoczu (mmol/l),
albuminy – stężenie albumin w osoczu (g/l).

Stężenie wapnia i magnezu w moczu przeliczono na wydalanie dobowe, uwzględniając wielkość dobowego wydalania moczu, oraz na jednostkę kreatyniny wydalanej w moczu.

Po zakończeniu doświadczenia, bezpośrednio po pobraniu krwi, wypreparowywano tłuszcz krezkowy, a jego ilość określono wagowo z dokładnością do ± 0,001 g.

Do analiz pobrano także mięsień sercowy, wątrobę, mięsień udowy (*biceps femoris*) oraz kość udową (*femur*) z prawej kończyny. W próbkach, pobranych zawsze z tego samego miejsca z wyizolowanych narządów, oznaczono zawartość wapnia i magnezu. Pierwiastki w badanym materiale, zmineralizowanym w piecu mikrofalowym Microwave produkcji firmy Anton Paar, oznaczono metodą spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie argonowej (ICP OES), z użyciem aparatu Optima 2000 DV produkcji firmy Perkin Elmer. Odważki o masie około 0,6 g lub całą kość dokładnie oczyszczoną z tkanek miękkich według metodyki podanej przez Dumas i in. (2006) przeniesiono do ciśnieniowych naczyń kwarcowych, do których dodano następnie 5,0 ml 65-proc. HNO_3 (Suprapur produkcji firmy Merck) i 0,5 ml 30-proc. H_2O_2 (Suprapur produkcji firmy Merck). Po zamknięciu naczyń całość umieszczono w piecu mikrofalowym, wyposażonym w układ stałej kontroli temperatury i ciśnienia w każdym z naczyń kwarcowych. Mineralizację prowadzono po wybraniu odpowiedniej procedury proponowanej przez producenta sprzętu: 0–5 min – liniowy gradient mocy 100–600 W, 6–10 min – 600 W (const.), 11–20 min – 1000 W lub mniej po osiągnięciu wartości granicznej (75 MPa lub 300^{o}C), 21–35 min – schładzanie naczyń. Schłodzony mineralizat przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o pojemności 100 ml. W tak przygotowanych roztworach oznaczono wapń i magnez w tkankach miękkich. Aby oznaczyć ilość tych pierwiastków w kościach, próbki rozcieńczono 250 (wapń) i 20 razy (magnez), uzyskując zakres stężeń optymalny dla metody ICP. Jako standardu użyto certyfikowanego wzorca wielopierwiastkowego ICP Multielement Standard IV firmy Merck. Roztwory wzorców uzupełniono dodatkiem kwasów stosowanych do mineralizacji w takim stężeniu, jakie występowało w mineralizowanych próbkach. Dążąc do dalszego zminimalizowania możliwych zakłóceń w podawaniu próbki do plazmy i innych zaburzeń typu fizycznego w plazmie argonowej, analizy wykonano metodą wzorca wewnętrznego, przez wprowadzenie do roztworów próbek oraz wzorców itru (Y) w stężeniu 0,5 mg/l Y. Wszystkie pomiary intensywności emitowanego promieniowania wykonano w spektrometrze Perkin Elmer, wybierając dłuższą, aksjalną drogę optyczną (wzdłuż plazmy).

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej odrzucono dwie wartości odstające (Taylor 1997), które stwierdzono dla stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu we krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną. Uzyskane wyniki analiz krwi, osocza, surowicy

i tkanek, po sprawdzeniu jednorodności wariancji testem Levene'a i normalności rozkładu testem chi^2, poddano obliczeniom statystycznym z użyciem programu Statistica, z zastosowaniem testu Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0{,}01$ i $\alpha = 0{,}05$. Aby zbadać zależności pomiędzy stężeniem hormonów kalciotropowych a ilością tłuszczu krezkowego, wyliczono współczynnik korelacji Pearsona dla stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu oraz parathormonu i ilości tłuszczu krezkowego w przeliczeniu na 100 g masy ciała.

4. Wyniki

Analizując ilość paszy spożywanej przez zwierzęta, stwierdzono istotny związek między wielkością jej pobrania a zmianą składu diety (tabela 4). Zwierzęta żywione paszą zmodyfikowaną spożyły jej istotnie mniej od zwierząt żywionych paszą podstawową. Jednak w przeliczeniu na jednostkę masy ciała wielkość pobrania nie różniła się istotnie między grupami.

Ponieważ prowadzone badania miały na celu określenie wpływu zmiany składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na gospodarkę wapniem i magnezem, wyliczono także spożycie obu tych składników wraz z paszą i płynami.

Stwierdzono, że samce, w których żywieniu zastosowano paszę zmodyfikowaną, spożywały istotnie mniej wapnia i magnezu.

Przyczyną tego zjawiska dla magnezu była jego mniejsza zawartość w paszy zmodyfikowanej. W przypadku wapnia główne znaczenie miało mniejsze spożycie paszy, sumujące się jednak z mniejszą zawartością tego pierwiastka w diecie.

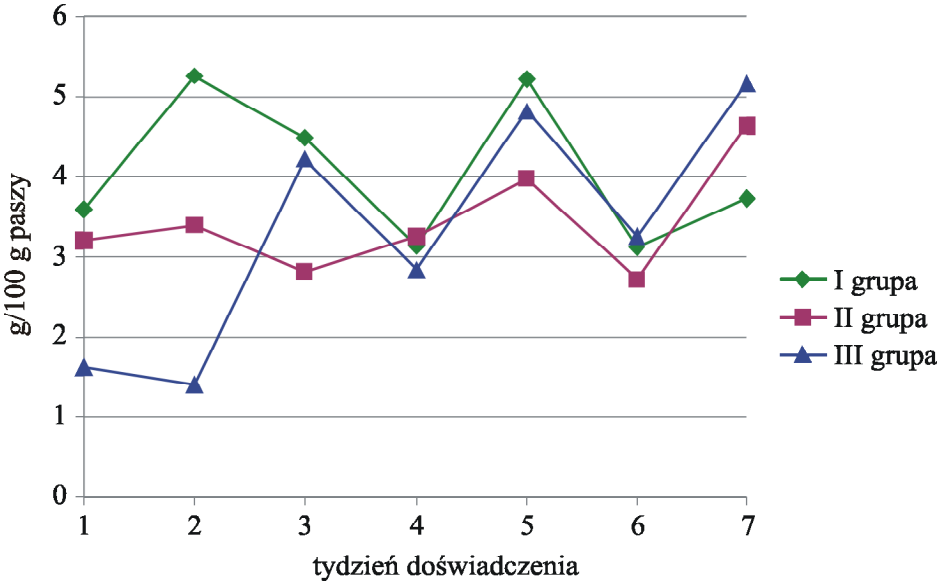
Tabela 4. Wpływ składu diety i zastosowanej suplementacji na pobieranie paszy, płynów, wapnia i magnezu przez samce ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Spożycie	I grupa (a)[1]	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Spożycie paszy (g/7 tygodni)	1078 ± 51	1014 ± 40	1002 ± 63	a – b*, a – c*
Spożycie paszy (g/100 g masy ciała/24 h)	4,70 ± 0,20	4,56 ± 0,26	4,53 ± 0,21	–
Spożycie wapnia ogółem (mg/100 g masy ciała/24 h)	52,7 ± 2,17	50,2 ± 2,87	50,0 ± 2,75	a – b*, a – c*
Spożycie magnezu ogółem (mg/100 g masy ciała/24 h)	15,2 ± 0,63	13,2 ± 0,76	13,1 ± 0,60	a – b**, a – c**
Spożycie wapnia z paszą (mg/100 g masy ciała/24 h)	52,2 ± 2,19	49,7 ± 2,85	49,4 ± 2,25	a – b*, a – c*
Spożycie magnezu z paszą (mg/100 g masy ciała/24 h)	15,0 ± 0,63	13,1 ± 0,75	13,0 ± 0,59	a – b**, a – c**
Spożycie płynów (ml/100 g masy ciała/24 h)	7,64 ± 0,94	7,28 ± 1,22	7,03 ± 0,64	–
Spożycie wapnia z płynami (mg/100 g masy ciała/24 h)	0,55 ± 0,07	0,52 ± 0,09	0,51 ± 0,05	–
Spożycie magnezu z płynami (mg/100 g masy ciała/24 h)	0,126 ± 0,015	0,120 ± 0,020	0,119 ± 0,011	–

* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.
** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.
[1] Oznaczenia literowe grup wykonane w celu technicznego ułatwienia wykazania istotności różnic pomiędzy grupami w kolumnie 5.

Ponieważ badane zwierzęta wypijały porównywalną objętość płynów, nie stwierdzono istotnych różnic w ilości składników mineralnych dostarczonych wraz z płynami.

Analizując dynamikę przyrostów masy ciała w trakcie doświadczenia, stwierdzono, że była ona różna w poszczególnych grupach zwierząt (rysunek 1). Największe różnice w przyrostach zaobserwowano po dwóch tygodniach doświadczenia. W okresie czwartego–szóstego tygodnia przyrosty te były zbliżone, a w siódmym tygodniu większe u zwierząt karmionych paszą zmodyfikowaną. Zasadniczo jednak u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną, tak niesuplementowaną, jak i suplementowaną, można zauważyć wzrostową tendencję, jeśli chodzi o przyrosty masy w trakcie trwania doświadczenia.



Rysunek 1. Dynamika przyrostów masy ciała zwierząt w czasie doświadczenia (n = 42)

Ogólnie jednak nie stwierdzono istotnego wpływu składu diety i suplementacji na wielkość przyrostów masy ciała, tak bezwzględnie, jak i w przeliczeniu na 100 g spożytej paszy (tabela 5).

Tabela 5. Wpływ składu diety i suplementacji na przyrosty masy ciała oraz ilość tłuszczu krezkowego u samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Cecha	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Przyrost masy ciała (g/7 tygodni)	44,6 ± 17,6	33,8 ± 15,3	33,4 ± 20,1	–
Przyrost masy ciała (g/100 g spożytej paszy)	4,06 ± 1,64	3,32 ± 1,48	3,82 ± 1,23	–
Tłuszcz krezkowy (g)	4,40 ± 0,595	4,23 ± 0,523	5,22 ± 0,804	a – c**, b – c**
Tłuszcz krezkowy (g/100 g masy ciała)	0,938 ± 0,106	0,928 ± 0,082	1,16 ± 0,169	a – c**, b – c**
Tłuszcz krezkowy (g/100 g spożytej paszy)	0,408 ± 0,051	0,417 ± 0,047	0,522 ± 0,076	a – c**, b – c**
** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.				

Natomiast istotny wpływ wywarła zastosowana suplementacja na ilość tłuszczu krezkowego, zarówno w wartościach bezwzględnych, jak i w przeliczeniu na 100 g masy ciała i na 100 g spożytej paszy. Jego ilość u zwierząt tej grupy była znamiennie większa.

Analizując stężenia wybranych hormonów biorących udział w metabolizmie wapnia, stwierdzono istotny wpływ zastosowanej suplementacji na stężenie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (tabela 6). Było ono istotnie wyższe w surowicy krwi zwierząt tej grupy.

Nie stwierdzono istotnego wpływu tak zmiany składu diety, jak i suplementacji na stężenie parathormonu.

Można jednak zauważyć, że u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną stężenie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu było niższe, a stężenie parathormonu wyższe od oznaczonego u zwierząt żywionych paszą podstawową.

Tabela 6. Wpływ składu diety i suplementacji na stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu i parathormonu w surowicy krwi samców ($\overline{x}$ ± SD, n = 42)

Hormon	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
1,25-dihydroksycholekalcyferol (pmol/l)	154 ± 14,8	137 ± 17,1	162 ± 33,5	b – c*
Parathormon (ng/l)	74,2 ± 30,6	86,6 ± 30,0	90,4 ± 46,7	–
* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.				

Analiza korelacji pomiędzy stężeniem 1,25-dihydroksycholekalcyferolu a ilością gromadzonego tłuszczu krezkowego wykazała istotną ujemną zależność wartości tych parametrów dla grupy zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną (tabela 7).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem parathormonu a ilością tłuszczu krezkowego. Jednak w przypadku grupy żywionej paszą zmodyfikowaną suplementowaną można zauważyć pewną tendencję do ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem parathormonu a ilością tłuszczu krezkowego.

Tabela 7. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,25-dihydroksycholekalcyferolu oraz parathormonu w surowicy krwi a ilością tłuszczu krezkowego u samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Cecha	I grupa	II grupa	III grupa
Stężenie $1,25(OH)_2D_3$ w surowicy krwi × ilość tłuszczu krezkowego			
Wartość współczynnika korelacji Pearsona (r)	–0,424	–0,651	–0,282
Współczynnik prawdopodobieństwa (p)	0,131	0,016	0,401
Stężenie PTH w surowicy krwi × ilość tłuszczu krezkowego			
Wartość współczynnika korelacji Pearsona (r)	0,399	–0,093	–0,488
Współczynnik prawdopodobieństwa (p)	0,158	0,752	0,077

Ponieważ do interpretacji uzyskanych wyników niezbędna była analiza wartości dodatkowych, wybranych parametrów krwi, stwierdzono istotny wpływ zmiany składu diety na wzrost stężenia albumin w osoczu (tabela 8). Zastosowane czynniki doświadczenia nie wywarły natomiast istotnego wpływu na wartość wskaźnika hematokrytowego, aktywność fosfatazy zasadowej oraz γ-glutamylotranspeptydazy.

Tabela 8. Wartości wybranych cech niezbędnych do interpretacji wyników uzyskanych u samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Parametr	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Albuminy (g/l)	25,6 ± 1,27	27,1 ± 0,52	26,6 ± 0,92	a – b**, a – c*
Hematokryt (l/l)	0,43 ± 0,12	0,44 ± 0,18	0,44 ± 0,14	–
Fosfataza zasadowa (U/L)	53,6 ± 9,79	61,4 ± 11,2	54,4 ± 10,2	–
γ-glutamylotranspeptydaza (U/L)	10,5 ± 2,53	9,81 ± 1,82	9,26 ± 3,15	–
* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$. ** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.				

Analizując całkowite stężenie wapnia w osoczu, stwierdzono, że było ono istotnie wyższe u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną, tak niesuplementowaną, jak i suplementowaną (tabela 9).

Stwierdzony wpływ zmiany składu diety mógł być jednak pośredni, bezpośrednio wpływając na zmiany stężenia albumin (tabela 8), ponieważ po wyliczeniu stężenia wapnia skorygowanego o zawartość albumin nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami zwierząt. Także stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu było porównywalne we wszystkich grupach (tabela 9). Zastosowana suplementacja wywarła natomiast istotny wpływ na stężenie wapnia w pełnej krwi. U zwierząt żywionych paszą suplementowaną było ono istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniem oznaczonym u pozostałych samców, co może wskazywać na krwinkowe pochodzenie tego składnika.

Pewność taką daje wyliczenie stężenia wapnia w erytrocytach po uwzględnieniu wskaźnika hematokrytowego, którego wartość w badanych grupach była porównywalna. Uzyskane wyniki potwierdziły, że stężenie wapnia w krwinkch czerwonych było istotnie wyższe u zwierząt żywionych paszą suplementowaną niż u pozostałych samców.

Tabela 9. Wpływ składu diety i suplementacji na stężenie wapnia w osoczu i pełnej krwi oraz zawartość wapnia w kościach samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Stężenie/zawartość wapnia	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Całkowite stężenie Ca w osoczu (mmol/l)	1,53 ± 0,029	1,60 ± 0,043	1,57 ± 0,060	a – b*, a – c*
Stężenie Ca skorygowanego w osoczu (mmol/l)	1,82 ± 0,04	1,86 ± 0,04	1,84 ± 0,05	–
Stężenie Ca zjonizowanego w osoczu (mmol/l)	0,72 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,72 ± 0,03	–
Stężenie Ca w pełnej krwi (mmol/l)	4,72 ± 0,24	4,84 ± 0,25	5,09 ± 0,21	a – c**, b – c*
Szacowane stężenie Ca w erytrocytach (mmol/l)	8,93 ± 0,45	8,98 ± 0,34	9,50 ± 0,34	a – c**, b – c**
Kość udowa (g/kg)	178 ± 5,4	185 ± 5,6	179 ± 4,85	a – b*
* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$. ** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.				

Analizując zawartość wapnia w kościach samców, stwierdzono, że istotny wpływ na ilość tego pierwiastka wywarła tylko zmiana składu diety, bez jej suplementacji. W kościach zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną zawartość tego pierwiastka była istotnie większa od oznaczonej u zwierząt żywionych paszą podstawową. U zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną zawartość ta była porównywalna do oznaczonej w grupie żywionej paszą podstawową.

Analizując ilość wapnia wydalanego z moczem, stwierdzono, że była ona istotnie większa u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną niż u pozostałych samców (tabela 10). Wartości te – zarówno dotyczące wydalania dobowego, jak i przeliczone na ilość wydalanej kreatyniny – były większe. Dobowe wydalanie wapnia z moczem przez zwierzęta żywione paszą suplementowaną było w przybliżeniu aż o 150% większe w porównaniu z ilościami wydalanymi przez pozostałe samce.

Tabela 10. Wpływ składu diety i suplementacji na wydalanie wapnia z moczem przez samce ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Wydalanie wapnia	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Wydalanie Ca z moczem				
mmol/24 h	0,036 ± 0,016	0,037 ± 0,015	0,090 ± 0,053	a – c**, b – c**
mmol Ca/mmol kreatyniny	0,226 ± 0,104	0,254 ± 0,118	0,595 ± 0,206	a – c**, b – c**
** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.				

Analiza zawartości wapnia w badanych tkankach wykazała, że wpływ zmiany składu diety istotnie zaznaczył się tylko w wątrobie (tabela 11). Zawartość wapnia w wątrobach zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną była istotnie mniejsza w porównaniu z oznaczoną u zwierząt żywionych paszą podstawową. Należy jednak zauważyć, że była ona zbliżona do zawartości stwierdzonej u samców żywionych paszą suplementowaną.

Nie obserwowano natomiast istotnego wpływu zastosowanej suplementacji na zawartość wapnia w badanych tkankach. Stwierdzono jednak sumaryczny wpływ składu diety i suplementacji, który zaznaczył się statystycznie istotnym wzrostem zawartości wapnia w mięśniu sercowym.

Tabela 11. Wpływ składu diety i suplementacji na zawartość wapnia w mięśniu udowym, sercowym oraz wątrobie samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Badana tkanka	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Mięsień udowy (mg/kg)	64,2 ± 6,54	70,2 ± 10,0	69,8 ± 5,7	–
Mięsień sercowy (mg/kg)	34,2 ± 2,56	35,1 ± 2,82	38,1 ± 2,87	a – c*
Wątroba (mg/kg)	49,9 ± 5,71	45,3 ± 2,25	46,1 ± 4,02	a – b*
* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.				

Analizę wpływu zastosowanych czynników na wybrane parametry gospodarki magnezem przedstawiono w tabelach 12–14.

Nie stwierdzono istotnego wpływu zmiany składu diety i/lub suplementacji na stężenie magnezu w osoczu (tabela 12).

Zastosowana suplementacja wywarła natomiast istotny wpływ na stężenie badanego pierwiastka w pełnej krwi zwierząt. U samców żywionych paszą suplementowaną było ono istotnie wyższe niż u pozostałych zwierząt.

Wyższe stężenie magnezu w erytrocytach zwierząt żywionych paszą suplementowaną, oszacowane na podstawie stężenia magnezu oznaczonego w osoczu i w pełnej krwi oraz po uwzględnieniu wartości wskaźnika hematokrytowego, wskazuje na krwinkowe pochodzenie tego składnika.

Nie obserwowano wpływu zmiany składu diety lub suplementacji na zawartość magnezu w kości udowej zwierząt. Natomiast łączny wpływ zastosowanych czynników zaznaczył się istotnym zmniejszeniem zawartości magnezu w kości (tabela 12).

Tabela 12. Wpływ składu diety i suplementacji na stężenie magnezu w osoczu i pełnej krwi oraz zawartość magnezu w kości udowej samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Stężenie/zawartość magnezu	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Całkowite stężenie Mg w osoczu (mmol/l)	0,676 ± 0,038	0,686 ± 0,044	0,705 ± 0,045	–
Stężenie Mg skorygowanego w osoczu (mmol/l)	0,747 ± 0,037	0,761 ± 0,058	0,780 ± 0,043	–
Stężenie Mg w pełnej krwi (mmol/l)	3,78 ± 0,161	3,85 ± 0,200	4,22 ± 0,182	a – c**, b – c**
Szacowane stężenie Mg w erytrocytach (mmol/l)	7,83 ± 0,291	7,88 ± 0,414	8,65 ± 0,501	a – c**, b – c**
Kość udowa (g/kg)	3,35 ± 0,078	3,24 ± 0,19	3,20 ± 0,11	a – c*

* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.
** Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$.

Biorąc po uwagę ilość magnezu wydalanego z moczem, tak dobowo, jak i w przeliczeniu na ilość wydalanej kreatyniny, stwierdzono, że wpływ w tym zakresie wywarła zmiana składu diety i jej suplementacja, działające łącznie (tabela 13). Ilość magnezu wydalanego z moczem w tej grupie była mniejsza w porównaniu z grupą żywioną paszą podstawową.

Tabela 13. Wpływ składu diety i suplementacji na wydalanie magnezu z moczem przez samce ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Wydalanie magnezu	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Wydalanie Mg z moczem				
mmol/24 h	0,229 ± 0,071	0,191 ± 0,044	0,134 ± 0,098	a – c*
mmol Mg/mmol kreatyniny	1,52 ± 0,84	1,30 ± 0,79	0,65 ± 0,37	a – c*

* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.

Analizując zawartość magnezu w badanych tkankach, istotny wpływ dla zmiany składu diety stwierdzono tylko w mięśniu sercowym (tabela 14). Zawartość tego składnika u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną była większa od oznaczonej w mięśniu sercowym samców żywionych paszą podstawową.

Natomiast zastosowana suplementacja wywarła istotny wpływ na zawartość magnezu w wątrobie badanych zwierząt. Zawartość ta u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną była istotnie mniejsza w porównaniu z oznaczoną w wątrobach zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną.

Tabela 14. Wpływ składu diety i suplementacji na zawartość magnezu w mięśniu udowym, sercowym oraz wątrobie samców ($\overline{x}$ ± SD; n = 42)

Badana tkanka	I grupa (a)	II grupa (b)	III grupa (c)	Istotność różnic
Mięsień udowy (mg/kg)	292 ± 7,24	286 ± 5,55	291 ± 4,82	–
Mięsień sercowy (mg/kg)	216 ± 3,88	224 ± 7,14	219 ± 5,6	a – b*
Wątroba (mg/kg)	227 ± 7,91	231 ± 11,2	220 ± 8,09	b – c*
* Różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,05$.				

5. Dyskusja

Podstawą do przeprowadzenia eksperymentu były wyniki badań, w których stwierdzono istotny wpływ zmiany składu diety i zastosowanej suplementacji wybranymi witaminami z grupy B na ilość paszy pobieranej przez badane zwierzęta, zmiany masy ciała oraz ilość i lokalizację gromadzonej tkanki tłuszczowej (Friedrich i in. 2002, Sadowska 2004, Friedrich i Sadowska 2005a). Analizując wyniki eksperymentu omawianego w niniejszej pracy, stwierdzono, że zmiana składu diety tylko nieznacznie wpłynęła na wielkość pobierania paszy przez badane zwierzęta. Mniejsza zawartość wapnia i magnezu w paszy zmodyfikowanej oraz obniżone jej spożycie przełożyły się jednak na statystycznie istotnie mniejsze pobranie wapnia i magnezu przez zwierzęta żywione tą paszą.

Założenia przeprowadzonego doświadczenia uwzględniały wpływ suplementacji na wzrost gromadzenia wisceralnej tkanki tłuszczowej stwierdzony we wcześniejszych badaniach (Friedrich i Sadowska 2005a). Zależność tę potwierdzono także w eksperymencie omawianym w niniejszej pracy. Z danych literaturowych wynika, że obserwowany efekt może pośrednio wywierać wpływ na gospodarkę wapniem w ustroju (Halade i in. 2010, Russell i in. 2010, Zillikens i in. 2010, Bredella i in. 2011).

Regulacja metabolizmu wapnia opiera się na wielu mechanizmach, wśród których najważniejszą rolę odgrywa układ hormonalny. Hormonami bezpośrednio zaangażowanymi w metabolizm wapnia są 1,25-dihydroksycholekalcyferol ($1,25(OH)_2D_3$) i parathormon (PTH). Wyniki badań wskazują, że stężenia tych hormonów są skorelowane między innymi z masą ciała i ilością tkanki tłuszczowej (Andersen i in. 1986, Sun i Zemel 2007, Hjelmesaeth i in. 2009, Lagunowa i in. 2009, Lenders i in. 2009). Friedrich i in. (2002) oraz Friedrich i Sadowska (2005a) stwierdzili, że suplementacja diety witaminami z grupy B, zmniejszając przyrosty masy ciała badanych zwierząt, prowadziła do gromadzenia tkanki tłuszczowej okołosercowej i tłuszczu krezkowego oraz wzrostu zawartości tłuszczu w mięśniach zwierząt żywionych paszą suplementowaną. Także w doświadczeniu przedstawionym w niniejszej pracy zwierzęta, którym podawano suplementy, charakteryzowały się większą ilością tłuszczu krezkowego, co mogło przekładać się na stwierdzone u tych zwierząt wyższe stężenia $1,25(OH)_2D_3$.

Analizując wyniki badań innych autorów dotyczące wpływu aktywnej formy witaminy D_3 na metabolizm lipidowy, stwierdzono, że nie jest on jednoznacznie określony. W wielu badaniach wykazano, że stężenie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu jest dodatnio skorelowane z ilością tkanki tłuszczowej, natomiast stężenie 25-hydroksycholekalcyferolu ($25(OH)D_3$) jest odwrotnie skorelowane z tłuszczową masą ciała (Holecki i in. 2005, 2006, Sun i Zemel 2007). Shi i in. (2001) oraz Xue i in. (2001), badając mechanizm obserwowanej zależności, stwierdzili, że 1,25-dihydroksycholekalcyferol, przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, wywiera decydujący wpływ na metabolizm lipidów w adipocytach, nasilając lipogenezę i hamując lipolizę. W przeprowadzonych przez nich badaniach stężenie $1,25(OH)_2D_3$ było dodatnio skorelowane z tłuszczową masą ciała. Wyniki badań Morris i Zemela (2005) wskazują ponadto, że

$1,25(OH)_2D_3$ wpływa na ilość i lokalizację odkładanej tkanki tłuszczowej, nasilając jej centralne gromadzenie. Aktywuje on 11β-dehydrogenazę hydroksysteroidową typu 1 (11β-HSD-1), która bierze udział w przekształcaniu nieaktywnego 11-dehydrokortykosteronu w aktywny kortykosteron stymulujący odkładanie wewnątrzbrzusznej tkanki tłuszczowej. Masuzaki i in. (2001, 2003) obserwowali, że transgeniczne myszy, wykazujące nadekspresję genu 11β-HSD-1 w tkance tłuszczowej, odznaczały się umiarkowaną otyłością, ze znaczną jednak skłonnością do gromadzenia tłuszczu trzewnego. Lipogenetycznego wpływu $25(OH)D_3$ nie potwierdzają badania Rodriguez-Rodriguez i in. (2011), w których wykazano odwrotną korelację pomiędzy stężeniami $25(OH)D_3$ a masą ciała. Także Lagunova i in. (2011) stwierdzili, że zarówno stężenia 25-hydroksycholekalcyferolu, jak i 1,25-dihydroksycholekalcyferolu są odwrotnie skorelowane z masą ciała. Trudno jest jednak porównywać wyniki badań uzyskiwane przez różnych autorów, ponieważ w części badań określano tylko związek pomiędzy stężeniem $1,25(OH)_2D_3$ lub $25(OH)D_3$ w surowicy krwi a masą ciała, co nie jest równoznaczne z wpływem $1,25(OH)_2D_3$ na możliwość odkładania tkanki tłuszczowej.

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, że u zwierząt, w których żywieniu zastosowano suplementację diety witaminami z grupy B i u których stwierdzono istotnie większe gromadzenie tłuszczu krezkowego, obserwowano również wyższe stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu. Jednak korelacja pomiędzy stężeniem 1,25-dihydroksycholekalcyferolu a gromadzeniem tłuszczu krezkowego była istotna (ujemna) tylko dla grupy żywionej paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną. Można więc stwierdzić, że także w doświadczeniu omawianym w niniejszej pracy związek pomiędzy stężeniem $1,25(OH)_2D_3$ a ilością tłuszczu krezkowego nie był jednoznaczny. Wydaje się, że był on zależny od sposobu żywienia zwierząt. Być może wpływ witaminy D_3 na gospodarkę lipidową ustroju jest uzależniony od wysycenia organizmu wapniem i jego dystrybucji w ustroju.

W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych in vitro i in vivo Zemel i in. (2000) oraz Shi i in. (2001) wykazali, że wpływ $1,25(OH)_2D_3$ na gospodarkę lipidową jest pośredni i zachodzi przez modyfikację stężenia wapnia wewnątrz komórki. W badaniach tych wykazano dodatnią korelację pomiędzy masą ciała i ilością tkanki tłuszczowej a stężeniem $1,25(OH)_2D_3$ we krwi. Wyniki przedstawiane przez innych autorów, którzy w badaniach epidemiologicznych stwierdzili odwrotną korelację pomiędzy masą ciała i ilością tkanki tłuszczowej a stężeniem $1,25(OH)_2D_3$ we krwi, nie uwzględniały mechanizmu obserwowanej zależności, nie badano w nich także wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, które odgrywa zasadniczą rolę w gospodarce lipidowej. Nie można też wykluczyć, że organizm inaczej reaguje na egzogenną witaminę D_3, pochodzącą z pożywienia, a inaczej na endogenną, syntetyzowaną jako odpowiedź na zmniejszoną podaż wapnia (Bar i in. 1978, Goff i in. 1990). Goff i in. (1990) wykazali, że w zależności od pochodzenia witaminy D_3 (endogenna bądź egzogenna) może się zmienić zarówno ilość, jak i wrażliwość receptorów wiążących tę witaminę, a Ertürk i in. (2002) stwierdzili, że receptory wiążące witaminę D_3 charakteryzują się polimorfizmem, który może modyfikować odpowiedź organizmu na witaminę D_3 w zależności od jej pochodzenia.

Wielu autorów podkreśla również korzystne efekty wpływu wyższych stężeń $25(OH)D_3$ w surowicy krwi na stężenia wybranych wskaźników gospodarki lipidowej we krwi. Stwierdzo-

no, że stężenie 25(OH)D_3 w surowicy krwi jest dodatnio skorelowane ze stężeniem frakcji HDL cholesterolu, a ujemnie skorelowane ze stężeniem triacylogliceroli (Martini i Wood 2006, Botella-Carretero i in. 2007, Forouhi i in. 2008, Giovannucci i in. 2008, Lu i in. 2009, Delvin i in. 2010, Jorde i in. 2010, Richart i in. 2011). Mechanizm tego zjawiska według Auwerxa i in. (1992) polega na tym, że witamina D_3 jest niezbędna do utrzymania odpowiedniego stężenia apoproteiny A-1, będącej głównym składnikiem lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). W tym kontekście zastanawiający jest aterogenny profil wskaźników lipidowych we krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną witaminami z grupy B obserwowany we wcześniejszych badaniach. Należy jednak zauważyć, że korzystne efekty wpływu witaminy D_3 na stężenia parametrów gospodarki lipidowej we krwi dotyczyły jednej jej formy – 25-hydroksycholekalcyferolu. Natomiast 1,25-dihydroksycholekalcyferol, który – jak wykazały badania Zemela i in. (2000) oraz Shi i in. (2001) – nasila lipogenezę, takich efektów może już nie wywierać.

Wyższe stężenia czynnej formy witaminy D_3 stwierdzone w surowicy krwi samców żywionych paszą suplementowaną witaminami mogły być przyczyną niższych stężeń glukozy obserwowanych we wcześniejszych badaniach w surowicy krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną (Sadowska 2002, Goluch-Koniuszy i Wierzbicka 2011), przy równoczesnym braku zmian w stężeniu insuliny (Friedrich i in. 2007). Jest to związane z faktem, że kalcitriol stymuluje ekspresję receptorów insulinowych, zwiększając odpowiedź komórek na wzrastające stężenie glukozy we krwi (Pittas i in. 2007). Ze względu na wzrost akumulacji tkanki tłuszczowej u zwierząt żywionych paszą suplementowaną wydaje się, że w prowadzonych wcześniej badaniach własnych glukoza, po przetransportowaniu do komórki i ufosforylowaniu, była wprowadzana w szlak lipogenezy, co mogło być spowodowane przypuszczalnie wyższym stężeniem wapnia w komórce. Tłumaczyłoby to również większą akumulację okołonarządowej tkanki tłuszczowej obserwowaną we wcześniejszych badaniach i wzrost stężenia wskaźników lipidowych we krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną. Być może, poszukując wpływu zwiększonej akumulacji tkanki tłuszczowej na zmiany gospodarki wapniem w ustroju, znaleziono nie skutek, ale raczej ich przyczynę lub czynnik, który nasilił lipogenezę zainicjowaną innymi czynnikami.

Natomiast wyniki nielicznych badań jednoznacznie wskazują na dodatnią korelację pomiędzy stężeniem PTH a masą ciała i ilością tkanki tłuszczowej (Mosekilde i in. 1980, Andersen i in. 1986, Holecki i in. 2005, 2006). Związek pomiędzy stężeniem PTH a masą ciała autorzy tłumaczyli zmniejszonym stężeniem witaminy D_3 u osób otyłych, a w konsekwencji zmniejszonym wchłanianiem wapnia i obniżonym stężeniem wapnia zjonizowanego w surowicy krwi, w efekcie czego u osób otyłych dochodzi do wtórnej nadczynności przytarczyc i wzrostu stężenia PTH. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem parathormonu w surowicy krwi a ilością tłuszczu krezkowego. W przypadku grupy zwierząt żywionych paszą suplementowaną można jednak zauważyć tendencję do korelacji ujemniej.

McCarty i Thomas (2003) wysunęli hipotezę, że wyższe stężenia PTH przyczyniają się do dalszych przyrostów masy ciała w wyniku hamowania w komórkach tłuszczowych lipolizy stymulowanej przez aminy katecholowe. Podstawowymi komórkami wrażliwymi na działanie PTH są komórki nerek i kości, jednak receptory wiążące PTH znaleziono także

w błonach komórkowych adipocytów i miocytów, w których PTH stymuluje fosfolipazę C-β, indukując napływ wapnia do komórek (Begum i in. 1992, Akmal i in. 1993, Massry i Fadda 1993). Xue i in. (2001) stwierdzili, że wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia wapnia hamuje lipolityczny wpływ katecholamin na adipocyty. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, można przypuszczać, że istnieje mechanizm tzw. błędnego koła, polegający na tym, że otyłość pośrednio wpływa na wzrost stężenia PTH we krwi, a PTH stymuluje odkładanie tkanki tłuszczowej. Otyłość jest więc chorobą, której początek może być wywołany różnymi czynnikami, natomiast później jest czynnikiem „samosprawczym", nasilającym gromadzenie tkanki tłuszczowej.

Bezdyskusyjny jest natomiast wpływ $1,25(OH)_2D_3$ i PTH na gospodarkę mineralną ustroju. Ze względu na wszechstronną rolę wapnia w organizmie utrzymanie fizjologicznych stężeń tego pierwiastka w płynach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym jest jednym z głównych warunków prawidłowego funkcjonowania komórek.

Podstawowym parametrem biochemicznym, oznaczanym w badaniach laboratoryjnych, diagnostycznych i medycznych, określającym stan gospodarki wapniowej, jest jego stężenie w surowicy/osoczu krwi. Stężenie wapnia oznaczone w osoczu krwi badanych zwierząt, będące parametrem bardzo precyzyjnie regulowanym hormonalnie, mieściło się w zakresie normy fizjologicznej, która dla szczurów wynosi 1,33–3,25 mmol/l (Carpenter i in. 2001). Można jednak zauważyć, że u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną stężenie wapnia w osoczu krwi było wyższe. W kontekście stwierdzonego mniejszego spożycia wapnia przez zwierzęta z tych grup wydaje się to zastanawiające. Należy jednak powiedzieć, że po przeliczeniu całkowitego stężenia wapnia na wapń skorygowany względem albumin nie stwierdzono różnic w stężeniu tego składnika pomiędzy grupami zwierząt. Można więc przypuszczać, że oznaczone wyższe stężenie wapnia w osoczu krwi zwierząt, w których żywieniu zastosowano paszę zmodyfikowaną, było wynikiem różnic w stężeniu albumin, stanowiących układ transportowy dla tego składnika (Orrell 1971). Wpływ zmiany składu diety na gospodarkę białkową, powodujący wzrost stężenia albumin w osoczu krwi zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną, stwierdzono we wcześniejszych badaniach własnych (Friedrich i in. 2007, Goluch-Koniuszy i in. 2011).

Nie zmieniło się także stężenie wapnia zjonizowanego, który jest jedyną biologicznie aktywną formą tego pierwiastka. W kontekście innych zaobserwowanych zmian w gospodarce wapniem u badanych zwierząt wskazuje to na duże możliwości homeostatyczne w tym zakresie. Jest to zrozumiałe, ponieważ utrzymanie stężenia wapnia w surowicy/osoczu krwi na stałym poziomie jest niezmiernie istotne ze względu na jego rolę w regulowaniu wrażliwości komórek nerwowych, w mechanizmie skurczu mięśni, w tym mięśnia sercowego, w utrzymaniu cytoszkieletu komórkowego, w zjawiskach wzrostu i różnicowania się komórek oraz w procesach krzepnięcia i fibrynolizy (Kołłątaj i Szewczyk 2006b). Możliwość prawidłowego przebiegu wyżej wymienionych procesów jest uwarunkowana utrzymaniem stężenia wapnia w surowicy/osoczu krwi na stałym, odpowiednim poziomie, nawet kosztem jego przesunięć z innych obszarów organizmu do krwi. Dlatego też stężenie wapnia w osoczu/surowicy krwi nie jest dobrym wskaźnikiem określającym stan gospodarki wapniowej i nie musi pozostawać w równowadze z zawartością tego pierwiastka w tkankach.

Istotne zmiany w stężeniu wapnia w surowicy krwi, wykraczające poza zakres norm fizjologicznych, pojawiają się w konsekwencji zachwiania mechanizmów homeostatycznych, na skutek znacznej utraty tego kationu lub przesunięć pomiędzy poszczególnymi jego rezerwuarami i prowadzą do zaburzeń podstawowych funkcji organizmu. Mechanizmy homeostazy, odpowiedzialne za utrzymanie stanu równowagi i stałości składu przede wszystkim surowicy/osocza krwi, ale także płynu wewnątrzkomórkowego i śródmiąższowego, niezależnie od wpływów otoczenia, utrudniają interpretację wyników badań podstawowych, ponieważ stężenie składnika w surowicy/osoczu, pełnej krwi czy w moczu może nie odzwierciedlać stanu gospodarki danym składnikiem w organizmie.

Kalcemia jest wypadkową interakcji trzech procesów: wchłaniania wapnia z przewodu pokarmowego, wydalania wapnia przede wszystkim z moczem i odkładania lub uruchamiania tego pierwiastka z kośćca. Procesy te są regulowane przez 1,25-dihydroksycholekalcyferol, parathormon i kalcytoninę (Kołłątaj i Szewczyk 2006a).

1,25-Dihydroksycholekalcyferol (kalcitriol) oznaczany w przeprowadzonym doświadczeniu jest najaktywniejszą formą witaminy D i pełni funkcję hormonu, który wpływa przede wszystkim na wchłanianie wapnia z przewodu pokarmowego. Łączy się on ze swoistymi receptorami (VDR – ang. *vitamin D receptor*), znajdującymi się przede wszystkim w przewodzie pokarmowym, kościach i nerkach (Segura i in. 1999), ale także w wielu innych tkankach (Fraga i in. 2002, Mayne i in. 2011). VDR należy do receptorów steroidowych, które mogą być zlokalizowane w jądrze komórkowym lub w cytoplazmie komórki. W jelicie cienkim kalcitriol pobudza transkrypcję genów oraz powstawanie swoistego mRNA, kodującego białko wiążące wapń (CaBP – ang. *calcium binding protein*). Wzrost ilości CaBP w błonach komórkowych enterocytów, obserwowany pod wpływem wzrostu stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, może zwiększyć wchłanianie wapnia nawet o 20% (Ryżko 2001). Dlatego też mniejsze spożycie wapnia przez zwierzęta z grup żywionych paszą zmodyfikowaną mogło być kompensowane większym jego wchłanianiem, zwłaszcza w grupie szczurów karmionych paszą suplementową, u których obserwowano wyższe stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu.

Jednak w warunkach fizjologicznych najważniejszym regulatorem zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest parathormon. Prawie natychmiastowy wzrost stężenia wapnia w surowicy krwi, zachodzący pod wpływem parathormonu i synergistycznego działania 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, następuje przez jego mobilizację z kości. PTH zwiększa także reabsorpcję wapnia w kanalikach dystalnych nefronów, zmniejszając tym samym wydalanie tego pierwiastka z moczem (Lenarcik i in. 2006).

W przeprowadzonym doświadczeniu zwierzęta karmione paszą suplementowaną witaminami, charakteryzujące się nieznacznie większymi, ale z punktu widzenia statystycznego nieistotnymi stężeniami PTH, wydalały istotnie większe ilości wapnia z moczem, utrzymując jednak stężenie tego pierwiastka w osoczu krwi na poziomie zbliżonym do oznaczonego u zwierząt z pozostałych grup. Tak duże wydalanie wapnia musiało więc być u nich kompensowane zwiększonym jego wchłanianiem i/lub zubażać tkankowe zasoby tego pierwiastka.

Analizując wpływ składu diety i zastosowanej suplementacji na stężenie wapnia oznaczone w pełnej krwi, stwierdzono statystycznie istotnie większe jego stężenie we krwi samców

żywionych paszą suplementowaną w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami zwierząt. Ponieważ stężenie wapnia w osoczu krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną było tylko nieznacznie większe niż u żywionych paszą podstawową i porównywalne do oznaczonego u zwierząt karmionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną, a wartość wskaźnika hematokrytowego u zwierząt ze wszystkich badanych grup była zbliżona, można przypuszczać, że wyższe stężenie wapnia w pełnej krwi samców żywionych paszą suplementowaną było związane z jego większym stężeniem w elementach morfotycznych krwi, w tym w erytrocytach. Przypuszczenie to potwierdzono pośrednio, wyliczając stężenie wapnia w erytrocytach według stosownego wzoru. Otrzymane wyniki należy jednak traktować z dużym dystansem, ponieważ wapń może być także wiązany w błonie komórkowej erytrocytów.

Zbyt wysokie stężenie wapnia jest toksyczne dla komórki i może doprowadzić do jej śmierci. Dlatego istnieją bardzo sprawne mechanizmy usuwające nadmiar jonów tego pierwiastka z cytoplazmy. Nad wewnątrzkomórkową homeostazą wapniową czuwają mechanizmy aktywnego transportu przezbłonowego. Jony Ca^{2+} są usuwane z cytoplazmy przez pompy wapniowe (PMCA – ang. *plasma membrane* Ca^{2+} *ATP-ase*) oraz wymienniki Na^{+}/Ca^{2+} na zewnątrz komórki (Burette i in. 2009). Natomiast pompy wapniowe retikulum sarko-endoplazmatycznego (SERCA – *sarco-endoplasmatic reticulum* Ca^{2+} *ATP-ase*) wpompowują jony Ca^{2+} do rezerwuarów wewnątrzkomórkowych, głównie retikulum endoplazmatycznego (Bode i in. 2011). Ponieważ erytrocyty ssaków nie mają błon wewnątrzkomórkowych, można przyjąć, że wyliczone stężenie wapnia w erytrocytach jest stężeniem w cytoplazmie komórki. Dlatego też na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że czynniki doświadczenia zastosowane w III grupie (w której zmieniono zwierzętom skład diety, dodając wybrane witaminy z grupy B) przyczyniały się do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Jednak wyniki uzyskane dla erytrocytów należy interpretować bardzo ostrożnie w stosunku do innych komórek, które mają wyraźne struktury wewnątrzkomórkowe, mogące magazynować wapń, co zmienia przebieg procesów metabolicznych w ich cytozolu.

Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia wapnia może świadczyć o uruchomieniu aktywnych mechanizmów, nasilających dokomórkowy transport jonów wapnia. Może być on także wynikiem destabilizacji błony komórkowej i wzrostu jej przepuszczalności, między innymi na skutek działania wolnych rodników. W zbliżonym układzie doświadczenia Friedrich i Dolot (2009, 2010) obserwowały nasilenie reakcji wolnorodnikowych u zwierząt, w których żywieniu zastosowano zmianę składu diety i jej suplementację witaminami z grupy B. Czynniki te zaburzały równowagę antyoksydacyjną nie tylko na skutek zubożenia diety zmodyfikowanej w naturalne przeciwutleniacze, ale także przez bezpośredni prooksydacyjny wpływ zastosowanych witamin na lipidowe składniki błon komórkowych (Higashi-Okai i in. 2006). Niezależnym czynnikiem wzrostu natężenia procesów wolnorodnikowych są również zmiany metabolizmu lipidów obserwowane u zwierząt żywionych paszą suplementowaną, polegające między innymi na wzroście akumulacji okołonarządowej tkanki tłuszczowej (Olusi 2002, Friedrich i Dolot 2009, 2010, Tomofuji i in. 2009).

Na działanie wolnych rodników szczególnie wrażliwe są składniki błon biologicznych, w tym boczne łańcuchy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, warunkujących płynność części lipidowych błon. Produkty peroksydacji lipidów powstające podczas reakcji wolno-

rodnikowych modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, naruszając ich integralność i zwiększając przepuszczalność dla substancji polarnych. Wolne rodniki zmniejszają także hydrofobowość lipidowego wnętrza błon komórkowych i zmieniają organizację dwuwarstwy. Zwiększa to przepuszczalność błon w sposób niespecyficzny. Peroksydacja lipidów powoduje również zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportujących (Hofmanova i in. 2005, Izzotti i in. 2006, Gałecka i in. 2008).

Nieodłącznym efektem działania wolnych rodników są także bezpośrednie zmiany oksydacyjne w białkach błonowych. Utlenienie błonowych grup sulfhydrylowych białek powoduje utratę aktywności biologicznej białka. Prowadzi to do zaburzeń działania wielu transporterów i enzymów, dzięki którym jony, w tym także wapnia, są aktywnie transportowane przez błony komórkowe i śródkomórkowe. Xiao i in. (2010) stwierdzili, że zachwianie mechanizmów oksydoredukcyjnych wpływa na zmniejszenie ekspresji genów kodujących białka błonowych pomp wapniowych (PMCA), zmniejszając ilość wapnia transportowanego odkomórkowo. Greensmith i in. (2010) stwierdzili także, że nasilona produkcja wolnych rodników obniża aktywność pompy wapniowej retikulum sarko-endoplazmatycznego (SERCA), zmniejszając ilość jonów Ca^{2+} transportowanych do rezerwuarów wewnątrzkomórkowych, i przyczynia się do wzrostu jego stężenia w cytoplazmie komórek.

Reakcje wolnorodnikowe zwiększają więc bierną przepuszczalność błony plazmatycznej oraz hamują działanie pomp wapniowych odpowiedzialnych za aktywny transport jonów wapnia na zewnątrz komórki. Konsekwencją tego jest zwiększenie wewnątrzkomórkowego, cytoplazmatycznego stężenia wapnia (Perez Valezquez i in. 1997, Frantseva i in. 2001). Jest to więc kolejny możliwy mechanizm „samonakręcania" się otyłości, nasilającej reakcje wolnorodnikowe, a te mogą przyczyniać się do dalszego gromadzenia tkanki tłuszczowej na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, który zwiększa lipogenezę i hamuje lipolizę. Zemel (2001) oraz Bougle i in. (2009) stwierdzili, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia przyczynia się również do powstawania insulinooporności i nadciśnienia tętniczego.

Obserwowany napływ wapnia do erytrocytów mógł być także stymulowany wpływem wyższego w tej grupie zwierząt stężenia czynnej formy witaminy D_3, która powoduje wzrost dokomórkowego transportu tego pierwiastka (Capiati i in. 2000, Picotto 2001, Shi i in. 2001, Xiaoyu i in. 2007). Jednak zwierzęta żywione paszą podstawową miały porównywalne do zwierząt karmionych paszą suplementowaną stężenie $1,25(OH)_2D_3$, a wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia było u nich istotnie niższe. Można więc przypuszczać, że zmiana stężenia wapnia w erytrocytach zwierząt żywionych paszą suplementowaną była spowodowana głównie destabilizacją błony komórkowej, w mniejszym natomiast stopniu wynikała z działania $1,25(OH)_2D_3$.

Nie można również wykluczyć, że na komórkowy wzrost stężenia wapnia mogła wpływać aktywna forma witaminy D_3 syntetyzowanej obwodowo.

Proces syntezy aktywnej formy witaminy D_3 przebiega wieloetapowo. Podczas pierwszego etapu jest wymagana hydroksylacja wątrobowa cholekalcyferolu przy węglu 25., następnie w nerkach przy węglu 1. Hydroksylacja nerkowa zachodzi pod wpływem obniżonego stężenia wapnia w surowicy krwi, między innymi na skutek jego zmniejszonego pobierania

z dietą. W procesie tym powstaje aktywna forma witaminy D – 1,25-dihydroksycholekalcyferol. Pierwotnie sądzono, że proces hydroksylacji $25(OH)D_3$ zachodzi tylko w nerkach, jednak obecnie wiadomo już, że przemiana ta następuje także w przewodzie pokarmowym, układzie kostnym, mięśniach, neuronach i limfocytach (Zehnder i in. 2001). Aktywnej formie witaminy D_3, powstałej pod wpływem tzw. hydroksylaz obwodowych, przypisuje się coraz większą rolę w oddziaływaniu na organizm, i to pomimo tego, że przekształcona obwodowo forma najprawdopodobniej nie jest uwalniana do krwiobiegu, ale działa lokalnie, w obrębie komórki, w której powstała, lub na komórki sąsiadujące.

Aby utrzymać homeostazę wapniową w surowicy/osoczu krwi przy zmniejszonym jego spożyciu lub zwiększonym wydalaniu, są uruchamiane zapasy z puli aktywnie uczestniczącej w homeostazie wapnia. Depozytem wapnia w organizmie są kości, z których pierwiastek ten może być stosunkowo łatwo uwalniany.

Tkanka kostna, oprócz funkcji podporowej i ochronnej dla niektórych narządów, odgrywa rolę wewnętrznego magazynu pierwiastków. Układ równowagi fizykochemicznej ustroju jest oparty między innymi na wzajemnych możliwościach „przepływu" składników mineralnych pomiędzy szkieletem, tkankami i płynami biologicznymi. Obniżenie stężenia wapnia w surowicy krwi jest sygnałem inicjującym wzrost stężenia $1,25(OH)_2D_3$ i PTH i powoduje zależny od jonów magnezu osteolityczny wpływ PTH na kości. W pierwszej fazie działania PTH dochodzi do zahamowania aktywności komórek kościotwórczych i aktywacji osteolizy osteocytarnej. Reakcja ta polega na rozpuszczeniu fosforanów wapnia osteoidu kwasami uwalnianymi przez osteocyty. Następnie jony są transportowane do płynu międzykomórkowego i krwi, przywracając równowagę. Dopiero w drugiej fazie działania PTH dochodzi do powstawania osteoklastów z komórek linii monocytarnej. Osteoklasty nie mają jednak receptorów wiążących PTH, a w odpowiedzi na wzrost stężenia tego hormonu pośredniczą osteoblasty, które wpływają na umiejscowienie, indukcję i stymulację resorpcji tkanki kostnej przez osteoklasty (Marks i Popoff 1990).

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że pomimo mniejszego spożycia wapnia przez zwierzęta żywione paszą suplementowaną, stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu krwi było u nich porównywalne do oznaczonego u zwierząt z pozostałych grup. Świadczy to o sprawnym funkcjonowaniu mechanizmów homeostatycznych, które utrzymują równowagę mineralną osocza i dostosowują metabolizm do mniejszej ilości wapnia w diecie, głównie przez wzrost jego wchłaniania. Na taki mechanizm zjawiska wskazuje istotny wzrost stężenia $1,25(OH)_2D_3$ odpowiedzialnej za wchłanianie wapnia. Reakcją szybką, uruchamianą w pierwszej kolejności w odpowiedzi na mniejsze spożycie wapnia, jest uwalnianie wapnia z kośćca, które nie zawsze musi być związane ze zmniejszeniem zawartości tego jonu w kościach (Marenzana i in. 2005). Można jednak zauważyć, że zwierzęta karmione paszą suplementowaną miały mniejszą zawartość wapnia w kościach (179 g/kg) niż żywione paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną (185 g/kg) i chociaż nie była to wartość statystycznie istotnie różna, to jednak zbliżona do oznaczonej u zwierząt żywionych paszą podstawową (178 g/kg). A ta była już istotnie mniejsza w stosunku do grupy żywionej paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną. Drugim, długofalowym efektem przywracania zachwianej równowagi jest synteza aktywnej formy witaminy D_3. Powstaje jednak pytanie, dlaczego takie mechanizmy nie zos-

tały uruchomione u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną, które również spożywały mniejszą ilość wapnia w porównaniu z grupą żywioną paszą podstawową? Być może odpowiedzią jest statystycznie istotnie większe wydalanie wapnia z moczem przez zwierzęta karmione paszą suplementowaną, co przyczynia się do zubożenia organizmu w ten składnik i wymusza konieczność uzupełnienia powstałych większych strat.

Stwierdzona nieznacznie mniejsza zawartość wapnia w kościach zwierząt karmionych paszą suplementowaną wydaje się zastanawiająca w kontekście większego gromadzenia tkanki tłuszczowej przez samce z tej grupy w porównaniu z pozostałymi grupami zwierząt. Wyniki wielu badań wskazują, że tkanka tłuszczowa wywiera ochronny wpływ na tkankę kostną (Harris i in. 1992, Riggs 2000, Negri i in. 2005). Jednak nie we wszystkich badaniach potwierdzono dodatnią korelację pomiędzy masą ciała a gęstością mineralną kości. Ochronny wpływ tkanki tłuszczowej na układ kostny nie jest więc jednoznaczny i wydaje się, że może być związany z lokalizacją tkanki tłuszczowej.

Obecnie uważa się tkankę tłuszczową za układ wydzielania wewnętrznego, który uwalnia różne związki, w tym czynniki wpływające na metabolizm kości (Hauner 2005, Holecki i in. 2008). Jednak rodzaj wydzielanych związków zależy od lokalizacji tkanki tłuszczowej. W obwodowej tkance tłuszczowej ekspresji ulega szereg enzymów biorących udział w syntezie i metabolizmie hormonów steroidowych, między innymi aromataza, która kontroluje konwersję androstendionu do estronu i testosteronu do estradiolu. Estrogeny działają ochronnie na kość zarówno u samic, jak i u samców (Turner i in. 1994, Sunyer i in. 1999). Oddziałują one na kości bezpośrednio, na co wskazuje obecność w kościach receptorów wiążących 17-β estradiol, jak i pośrednio, przez wpływ na wydzielanie hormonów biorących udział w regulacji homeostazy wapniowej. Natomiast wisceralna tkanka tłuszczowa wydziela czynnik martwicy nowotworu α (TNFα) oraz interleukinę 6 (IL-6), nasilające różnicowanie się komórek macierzystych w kierunku osteoklastów. Otyłości brzusznej towarzyszy także podwyższone stężenie glikokortykosteroidów stymulujących osteoklastogenezę i nasilających resorpcję tkanki kostnej (De Nijs 2008, Ding i in. 2011).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że samce żywione paszą zmodyfikowaną suplementowaną, przy porównywalnych do samców z innych grup przyrostach masy ciała, gromadziły więcej tłuszczu krezkowego. Można więc przypuszczać, że dominujący wpływ na metabolizm kostny miały u nich czynniki wydzielane przez wisceralną tkankę tłuszczową, nasilające procesy resorpcji kości. Nie zaznaczył się on jednak istotnym zmniejszeniem zawartości wapnia w kościach w stosunku do zwierząt żywionych paszą niesuplementowaną. Nie obserwowano również istotnych zmian w aktywności fosfatazy zasadowej, będącej odzwierciedleniem przyspieszenia tempa tworzenia kości w następstwie ich zwiększonej resorpcji (Marcinowska-Suchowierska i in. 1992, Romagnoli i in. 1998). Trudno jest jednak jednoznacznie wnioskować o wpływie zastosowanych czynników na możliwość zwiększonego ryzyka złamań osteoporotycznych, ponieważ wapń nie jest jedynym pierwiastkiem wpływającym na gęstość mineralną kości. Istotną rolę w ich mineralizacji odgrywa także magnez, którego zawartość w kościach zwierząt karmionych paszą suplementowaną była mniejsza w porównaniu ze zwierzątami z grupy żywionej paszą podstawową. Gęstość mineralna kości nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na ich wytrzymałość, określającą

ryzyko złamań. Kapelański i in. (2011) nie stwierdzili u świń korelacji pomiędzy zawartością wapnia i magnezu w kości a wieloma parametrami określającymi jej wytrzymałość. Także Rusińska i in. (2007) nie stwierdzili wpływu parametrów densytometrycznych i ultradźwiękowych kości na ryzyko złamań u dzieci, co sugeruje obecność innych niż obniżenie gęstości mineralnej przyczyn złamań. W badaniu tym autorzy sugerują, że mogą to być zaburzenia struktury części białkowej tkanki kostnej.

Nie można jednak zaprzeczyć, że obserwowane w przeprowadzonym doświadczeniu u zwierząt żywionych paszą suplementowaną zmiany gospodarki wapniowej, polegające na znacznym zwiększeniu wydalania wapnia z moczem, mogą prowadzić do zubożenia tkankowych zasobów wapnia i przyczynić się do rozwoju osteoporozy.

Wiadomo, że do prawidłowej mineralizacji kości niezbędne jest właściwe stężenie witaminy D_3, która umożliwia utrzymanie odpowiedniego stężenia wapnia we krwi. W tym kontekście zastanawiająca jest mniejsza, choć nieistotna statystycznie, zawartość wapnia w kościach zwierząt żywionych paszą suplementowaną przy wyższych stężenia $1,25(OH)_2D_3$ obserwowanych w ich surowicy krwi. Jednak wpływ witaminy D_3 na kości jest zależny również od stężenia PTH. Przy niskich jego stężeniach witamina D_3 sprzyja wbudowywaniu wapnia w kość, ale w obecności wyższych stężeń parathormonu aktywna forma witaminy D_3 stymuluje osteoblasty do wytwarzania limfokin proresorpcyjnych, IL-1, IL-6, pobudzających osteoklasty do wzmożonej resorpcji kości (Okada i in. 2002). Ten kierunek działania witaminy D_3, związany z resorpcją kości, powoduje podwyższenie stężenia wapnia w surowicy krwi, z jednoczesnym wzrostem jego filtracji w nefronie i paradoksalnie większym wydalaniem z moczem.

Przyczyną nieznacznie mniejszej zawartości wapnia w kościach samców, w których żywieniu zastosowano suplementację diety witaminami z grupy B, mógł być także wzrost stężenia wskaźników lipidowych we krwi stwierdzony we wcześniejszych badaniach własnych (Friedrich i Sadowska 2008) i nasilenie reakcji wolnorodnikowych (Friedrich i Dolot 2009, 2010) obserwowane u zwierząt żywionych paszą suplementowaną.

Stwierdzone około 10 lat temu częste współwystępowanie miażdżycy i osteoporozy skłoniło badaczy do poszukiwania wspólnych czynników etiopatogenetycznych. Prowadzone w tym kierunku badania wykazały, że utlenione lipidy wnikają do błony środkowej naczyń tętniczych i stymulują różnicowanie się komórek prekursorowych w kierunku osteoblastów, które wywołują mineralizację ściany naczynia (Demer i Tintut 2011). Parhami i in. (1997) stwierdzili, że utlenione lipidy gromadzą się także w macierzy kostnej, tuż pod endotelium naczynia w osteonie, w bliskim sąsiedztwie prekursorów osteoblastów, i tak zlokalizowane mogą hamować różnicowanie oraz aktywność komórek kościotwórczych. Brodeur i in. (2008) potwierdzili, że w tkance kostnej utlenione lipidy hamują proces różnicowania osteoblastów, co powoduje, że w procesie przebudowy przewagę zyskuje resorpcja kości. Rjavashisth i in. (1995) wykazali także, że utlenione lipidy stymulują komórki endotelium do produkcji czynnika wzrostu makrofagów (M-CSF – ang. *monocyte-macrophage colony stimulating factor*), który jest niezbędny do różnicowania komórek prekursorowych w kierunku osteoklastów. Wykazano również, że utlenione lipidy wywołują oporność kości na anaboliczne działanie PTH (Sage i in. 2011). Tak więc niekorzystny wpływ utlenionych lipidów na tkankę kostną polega nie tylko na hamowaniu procesu różnicowania osteoblastów, ale też na nasileniu

rekrutacji oraz różnicowania osteoklastów, czego efektem jest nadmierna resorpcja kości i rozwój osteoporozy.

Zjawisko uwapniania tkanek miękkich i demineralizacji kości wywoływane przez ten sam czynnik jest znane od dawna. Przykładem może być reakcja tkanek na czynnik infekcyjny lub ciało obce, w wyniku czego w tkankach miękkich tworzą się zwapnienia, a tkanka kostna ulega demineralizacji (Foltyn i in. 2003).

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że zawartość wapnia w badanej kości udowej zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną była wyższa niż u zwierząt żywionych paszą podstawową. Taki wpływ zmiany składu diety wydał się zastanawiający w świetle wyników wielu badań, prowadzących do wniosku, że obecność sacharozy w diecie niekorzystnie wpływa na gospodarkę mineralną ustroju i zmniejsza mineralną gęstość kości (Li i in. 1990, Zernicke i in. 1995, Tjaderhane i Larmas 1998, Lorincz i in. 2010). Zjawisko to mogłyby jednak tłumaczyć wyniki badań Friedrich (2004). Autorka ta stwierdziła, że u samców żywionych paszą, w której 10% wartości energetycznej stanowiła sacharoza, istotnie obniżało się stężenie kortykosteronu w surowicy krwi. Podobny efekt wpływu obecności w diecie łatwo przyswajalnych węglowodanów na stężenie kortyzolu obserwowała Friedrich (1995) u osesków bydlęcych.

Mechanizm niekorzystnego działania glikokortykosteroidów na tkankę kostną jest zróżnicowany, ale w efekcie prowadzi do spadku masy kostnej, zaburzeń struktury kości oraz do zwiększonego ryzyka złamań (Śliwa i in. 2006). Glikokortykosteroidy hamują proliferację i dojrzewanie prekursorów osteoblastów, wpływają na ich aktywność metaboliczną oraz czas przeżycia, prowadząc do apoptozy. Wykazywane mechanizmy ich działania sprawiają, że procesy kościotworzenia są hamowane, przez co przewagę uzyskują procesy kościogubne, które prowadzą do ubytku masy kostnej. Glikokorytkosteroidy zmniejszają także wchłanianie wapnia i fosforanów w jelicie cienkim przez hamowanie syntezy białka wiążącego wapń, a działanie to jest niezależne od obecności witaminy D, stąd też ich obniżone stężenie może przekładać się na wzrost zawartości wapnia w kościach.

Kolejnym interesującym zjawiskiem był fakt, że zwierzęta żywione paszą suplementowaną wydalały niemal trzykrotnie więcej wapnia z moczem niż zwierzęta z grupy żywionej paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną przy porównywalnym stężeniu wapnia w osoczu krwi i większej zawartości wapnia w mięśniu sercowym, ale mniejszej w wątrobie i nieznacznie mniejszej w kościach.

Wyniki badań, które prowadzili Rubinacci i in. (2002) oraz Marenzana i in. (2005), wskazują jednak, że uwalnianie wapnia z kości może odbywać się bez ich przebudowy, nie dając efektów w postaci zmniejszenia zawartości wapnia oznaczanej w kościach, ponieważ uwalniany wapń pochodzi z jonowymiennej powierzchniowej warstwy kości. Według nich taki mechanizm jest jednak krótkotrwały i uruchamiany w celu utrzymania homeostazy wapnia we krwi. Mardon i in. (2008) stwierdzili jednak, że nawet 19-miesięczny okres doświadczenia, podczas którego obserwowano hiperkalciurię u dorosłych samców szczura, nie zmieniał stężeń osteokalcyny w surowicy krwi i deoksypirydynoliny w moczu, będących czułym wskaźnikiem obrotu kostnego. Wapń wydalany z moczem przez badane przez nich zwierzęta nie mógł więc być uwalniany z kości. Podobnie było w przeprowadzonym doświadczeniu

własnym, w którym zwierzęta z grupy żywionej paszą suplementowaną wydalały trzykrotnie więcej wapnia z moczem niż pozostałe zwierzęta. Wapń ten musiał pochodzić z innego źródła niż kości i inne badane tkanki, w których nie stwierdzono znacząco mniejszej zawartości wapnia niż oznaczona w tych samych tkankach u zwierząt z pozostałych grup.

Obserwowane u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną większe wydalanie wapnia z moczem jest trudne do wytłumaczenia i może być spowodowane wieloma przyczynami, których poszukiwanie wymaga dalszych badań. Jest ono zastanawiające w kontekście istotnie wyższego stężenia $1,25(OH)_2D_3$ i zbliżonego stężenia parathormonu u zwierząt z tej grupy w porównaniu z grupą żywioną paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną.

W warunkach fizjologicznych zarówno PTH, jak i $1,25(OH)_2D_3$ nasilają resorpcję wapnia w kanalikach nerkowych w celu zatrzymania tego pierwiastka w organizmie i podniesienia jego stężenia w surowicy krwi. Jednak Poole i Reeve (2005) stwierdzili, że wpływ PTH, wynikający z farmakoterapii, zależy od tego, czy jest to działanie stałe (zbliżone do obserwowanego w warunkach fizjologicznych) czy pulsacyjne. Stałe działanie PTH, nawet w niewielkich stężeniach, powoduje resorpcję kości, podnosi stężenie wapnia w surowicy krwi, zwiększa jego filtrację w ciałku nerkowym i wydalanie z moczem (Wang i in. 2003).

Natomiast Goff i in. (1990) stwierdzili, że zmniejszone spożycie wapnia i spowodowane tym wyższe stężenie witaminy D_3 może wpływać na zmniejszenie liczby receptorów wiążących witaminę D_3 w kanalikach nerkowych, co powoduje wzrost wydalania wapnia z moczem.

Niewykluczone jest także, że przyczyną zwiększonego wydalania wapnia z moczem przez samce karmione paszą suplementowaną mogła być również zmiana składu kwasów tłuszczowych okołonarządowej tkanki tłuszczowej, zachodząca pod wpływem suplementacji diety witaminami z grupy B. Friedrich i Sadowska (2005b) stwierdziły bowiem wzrost ilości kwasu arachidonowego w lipidach okołonarządowej tkanki tłuszczowej zwierząt karmionych paszą suplementowaną w porównaniu ze zwierzątami żywionymi paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną, a Elliott i Goodfriend (1993) oraz Goodfriend i in. (1995) wykazali, że kwas ten hamuje przekształcanie cholesterolu w aldosteron. Przy zmniejszonych stężeniach aldosteronu wzrasta wydalanie sodu z moczem, które jest jednym z czynników determinujących zwiększone wydalanie wapnia (Creedon i Cashman 2000), zwłaszcza przy diecie ubogiej w wapń (Carbone i in. 2003). Efekt ten mógł być dodatkowo nasilany przez stres oksydacyjny, zachodzący pod wpływem suplementacji diety witaminami z grupy B (Friedrich i in. 2005, Friedrich i Dolot 2009, 2010). Fiebeler i Luft (2005) wykazali, że nasilenie reakcji wolnorodnikowych zmniejsza powinowactwo receptorów mineralokortykoidowych do aldosteronu, dodatkowo nasilając utratę sodu z moczem.

Zastanawiające jest jednak, dlaczego zwiększonego wydalania wapnia z moczem nie obserwowano u zwierząt żywionych paszą podstawową, u których we wcześniejszych badaniach własnych stwierdzono porównywalną do zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną zawartość kwasu arachidonowego w lipidach tłuszczu krezkowego (Friedrich i Sadowska 2005b) oraz porównywalne stężenia aldosteronu (Friedrich i in. 2007). Być

może to właśnie wzrost natężenia procesów wolnorodnikowych był czynnikiem różnicującym obie grupy i wpływającym na zróżnicowane wydalanie wapnia z moczem.

Czynnikiem żywieniowym, który zwiększa wydalanie wapnia z moczem, jest także większa zawartość białka w diecie (Wang i Zhao 1998). Pasze zastosowane w przeprowadzonych badaniach miały zbliżoną zawartość białka i były spożywane w porównywalnych ilościach, tak więc czynnik ten nie mógł mieć wpływu na obserwowane różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

Analizując zawartość wapnia w narządach badanych zwierząt, stwierdzono, że suplementacja diety witaminami z grupy B nie wywierała istotnego wpływu w tym zakresie. Stwierdzono jednak, że łączny wpływ dwóch zastosowanych czynników, tj. zmiany składu diety i suplementacji, spowodował istotny wzrost zawartości wapnia w mięśniu sercowym.

Predyspozycje tkanek do rozwoju zwapnień są większe podczas toczących się w nich procesów zapalnych (New i Aikawa 2011), wynikających między innymi z działania cytokin prozapalnych uwalnianych przez tkankę tłuszczową zlokalizowaną w pobliżu narządu. Być może przyczyną obserwowanych zmian w zawartości wapnia w mięśniu sercowym było większe odkładanie okołosercowej tkanki tłuszczowej u zwierząt żywionych paszą suplementowaną witaminami z grupy B, stwierdzone we wcześniejszych badaniach własnych (Friedrich i Sadowska 2005a). Działa ona jak bufor usuwający z krążenia nadmiar kwasów tłuszczowych zaburzających pracę serca (Marchington i in. 1989, Corradi i in. 2004). Jest jednak źródłem licznych cytokin, które działając lokalnie, mogą zapoczątkowywać procesy zapalne, przyczyniające się powstawania zwapnień.

Przechodzenie wapnia do kardiocytów mogło być również efektem obserwowanego w grupie żywionej paszą suplementowaną wyższego stężenia aktywnej formy witaminy D_3, która nasila dokomórkowy transport wapnia (Henley i in. 2005, Lopez i in. 2008). Większą zawartość wapnia stwierdzono jednak tylko w komórkach mięśnia sercowego i aby potwierdzić, czy wynikała ona z kalcyfikacji tego narządu, należałoby wykonać badania histologiczne.

W organizmie wapń i magnez występują w określonych stosunkach ilościowych. W warunkach fizjologicznych wzrost stężenia wapnia w osoczu/surowicy krwi oraz wzrost jego zawartości w tkankach pociąga za sobą podwyższenie stężenia magnezu (Szpetnar i Pasternak 2000). Jest to związane z rolą obydwu tych pierwiastków w przewodnictwie i pobudliwości nerwowo-mięśniowej.

Analizując uzyskane wyniki, można zauważyć, że stężenie magnezu w osoczu krwi zwierząt żywionych paszą suplementowaną było wyższe o 3% w stosunku do oznaczonego u zwierząt z grupy żywionej paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną, jednak różnica ta nie była statystycznie istotna. Na brak statystycznego potwierdzenia obserwowanych różnic musiała mieć wpływ wielkość odchylenia standardowego (ogółem 6,1% wartości średniej). Nie było ono duże, ale większe niż w przypadku wapnia (ogółem 2,8% wartości średniej). Z tego powodu zmiany całkowitego stężenia wapnia o 2,6% (pomiędzy grupą żywioną paszą zmodyfikowaną suplementowaną a podstawową) uzyskały potwierdzenie statystyczne, natomiast zmiana stężenia magnezu o 4,3% takiego potwierdzenia nie uzyskała.

Wskazuje to także na pewną niedoskonałość metod statystycznych w przypadku badań fizjologicznych. Czasami niewielka zmiana wielkości badanego parametru, niemająca znaczenia fizjologicznego, przy małej zmienności osobniczej uzyskuje potwierdzenie statystyczne, niekiedy większe zmiany wielkości cechy, istotne dla poszczególnych osobników, takiego potwierdzenia nie uzyskują.

Zasadniczo zakres norm fizjologicznych dla stężenia wapnia w surowicy krwi jest mały. Górna granica normy dla ludzi jest o 18% większa od dolnej granicy, natomiast w przypadku magnezu różnica między minimum a maksimum normy dla ludzi wynosi 50% minimalnej wartości (Dembińska-Kieć i Naskalski 1998). Wynika to z faktu, że stężenie magnezu w surowicy krwi jest z natury bardziej osobniczo zmienne niż stężenie wapnia i nie wpływa niekorzystnie na organizm. W przypadku szczurów zakresy norm są szersze, ponieważ określono je dla szczurów ogółem, ale w dużej mierze zależą od stada czy szczepu. Dlatego w przeprowadzonym doświadczeniu grupa szczurów żywiona paszą podstawową była traktowana jako grupa referencyjna.

Pomimo bogatego piśmiennictwa z zakresu fizjologicznej roli magnezu mechanizmy regulacji gospodarki magnezowej w ustroju nadal są mniej poznane w porównaniu z wapniem. Wiadomo jednak, że równowaga magnezowa jest utrzymywana hormonalnie i biorą w niej udział te same hormony, które regulują wchłanianie, wydalanie i dystrybucję wapnia. Badania wykazały, że wchłanianie magnezu jest zależne między innymi od składu diety i ilości w niej tego pierwiastka (Fine i in. 1991, Lobo i in. 2009, Jabłecka i in. 2011). Czynnikiem wspomagającym wchłanianie magnezu jest witamina B_6 (Majumdar i Boylan 1989) zawarta w mieszaninie witamin podawanych w roztworze wodnym zwierzętom z grupy żywionej paszą suplementowaną. Stąd też prawdopodobnie obserwowane wyższe stężenie magnezu w osoczu krwi zwierząt tej grupy.

Magnez uczestniczy w przebiegu wielu szlaków metabolicznych związanych z przemianą białek, lipidów i węglowodanów. Jest aktywatorem ponad 300 enzymów, między innymi aminotransferazy asparaginianowej, oraz bierze udział w syntezie ATP. Nieznacznie wyższe jego stężenia (o 0,019 mmol/l) w osoczu krwi zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną suplementowaną mogły być związane z nasileniem przemian metabolicznych wymuszonych obecnością w tej diecie sacharozy i większych ilości witamin z grupy B. Hipotezę tę potwierdzają badania Sadowskiej i Serwotki (2001) na samcach oraz Friedrich i in. (2009) na samicach szczura. W badaniach tych obserwowano wzrost aktywności aminotransferazy asparaginianowej w surowicy krwi zwierząt, zachodzący pod wpływem zastosowanej zmiany składu diety i suplementacji.

Należy jednak pamiętać, że stężenie magnezu w osoczu krwi, podobnie jak stężenie wapnia, nie musi pozostawać w równowadze z zawartością tego jonu w innych tkankach i nie jest dobrym testem do wykrywania ewentualnych zaburzeń w jego metabolizmie i stanie wysycenia organizmu magnezem (Huijgen i in. 2000). Część wyników badań świadczy o tym, że dobrym wskaźnikiem stanu odżywienia organizmu magnezem jest jego stężenie w erytrocytach (Guerin i in. 1996). Jednak wyniki badań, które prowadzili Basso i in. (2000), wskazują, że stężenie to nie wzrastało nawet podczas suplementacji diety magnezem u pacjentów z hipomagnezemią. W badaniach prowadzonych przez nich istotny okazał się wpływ suple-

mentacji na stężenie magnezu w surowicy krwi. W badaniach Malona i in. (2004) stwierdzono, że najlepszym wskaźnikiem stanu wysycenia organizmu magnezem jest oznaczenie stężenia magnezu zjonizowanego w erytrocytach. Jest to jednak badanie wykonywane w nielicznych ośrodkach badawczych ze względu na trudności metodyczne i duże wymagania aparaturowe.

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że zwierzęta żywione paszą zmodyfikowaną suplementowaną miały wyższe stężenie magnezu w pełnej krwi w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami zwierząt. Wzrost stężenia magnezu w pełnej krwi i szacowany na tej podstawie wzrost stężenia magnezu w erytrocytach szczurów karmionych paszą suplementowaną mógł być związany z wiekiem krwinek czerwonych. Wzrost natężenia reakcji wolnorodnikowych obserwowany przez Friedrich i Dolot (2010) u zwierząt żywionych paszą suplementowaną witaminami z grupy B mógł się przyczyniać do destabilizacji błon komórkowych, co skraca czas przeżycia krwinek czerwonych i nasila erytropoezę. Dzięki temu populacja erytrocytów jest częściej „odmładzana", a jak wykazano, młode erytrocyty zawierają większą ilość magnezu niż krwinki żyjące dłużej (Elin i in. 1980, Watson i in. 1980).

Sama destabilizacja błony komórkowej nie powinna natomiast bezpośrednio prowadzić do wzrostu zawartości magnezu w komórce. W warunkach fizjologicznych stężenie magnezu w komórce jest zależne przede wszystkim od wypływu tego kationu z komórki (Günther 2006). Z tego powodu wzrost biernej przepuszczalności błony komórkowej powinien się przyczynić do zmniejszenia stężenia magnezu w komórce i wzrostu stężenia w niej wapnia. Jest to zrozumiałe ze względu na przeciwstawne rozmieszczenie tych kationów po obydwu stronach błony komórkowej i odwrotny gradient ich stężeń, ułatwiający dyfuzję magnezu z komórki, a wapnia do komórki.

Obserwowane większe stężenie magnezu w erytrocytach zwierząt żywionych paszą suplementowaną mogło być też odpowiedzią organizmu na wzrost stężenia w nich wapnia, ponieważ magnez zapobiega nadmiernemu gromadzeniu wapnia w komórce (Wolf i in. 2003). Odgrywa on istotną rolę w aktywności pompy wapniowej (Ca^{2+}/Mg^{2+} ATP-azy), która warunkuje usuwanie jonów wapnia z cytoplazmy. Jest także naturalnym blokerem kanałów wapniowych i konkuruje z wapniem w transporcie przez błonę komórkową (James 1992, Fawcett i in. 1999).

Czułym regulatorem gospodarki magnezowej, zależnym jednak od wpływu wielu czynników, są nerki, które odgrywają najważniejszą rolę w utrzymaniu stałego stężenia magnezu we krwi. Magnez obecny we frakcjach przesączalnych ulega kanalikowej resorpcji zwrotnej w ilości zależnej od aktualnego stanu zasobów tkankowych. W warunkach niedoboru magnezu, związanego nie tylko z mniejszą jego ilością w diecie, ale także wzrostem zapotrzebowania na ten składnik diety, wzrasta resorpcja i maleje wydalanie magnezu z moczem, a pogłębiający się deficyt prowokuje reakcję obronną organizmu w postaci uwalniania tego pierwiastka z tkanek miękkich i kości. Zmniejszone wydalanie magnezu u zwierząt karmionych paszą suplementowaną i obniżona jego zawartość w wątrobie (w stosunku do wartości oznaczonej u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną niesuplementowaną) i kościach (w stosunku do wartości oznaczonej u zwierząt karmionych paszą podstawową) może więc świadczyć o zmniejszających się zasobach tkankowych tego pierwiastka.

Nerkowa resorpcja magnezu jest także zależna od obecności wapnia, który współzawodniczy z magnezem we wspólnych miejscach resorpcji w pętli Henlego. Dlatego też mniejsza resorpcja wapnia i obserwowane zwiększone jego wydalanie z moczem u zwierząt żywionych paszą suplementowaną mogło ułatwiać resorpcję magnezu w kanalikach nerkowych i powodować jego zmniejszone wydalanie z moczem.

Reasumując uzyskane wyniki, można zauważyć, że skutki zmiany składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B obserwowane w przeprowadzonym doświadczeniu są niejednoznaczne i wskazują na ogromną złożoność, wielokierunkowość i daleko idący wpływ zastosowanych czynników na organizm. Stwierdzone zmniejszone pobieranie wapnia i magnezu przez zwierzęta żywione paszą suplementowaną spowodowało zmiany adaptacyjne w ustroju, powodując wzrost stężenia $1,25(OH)_2D_3$ w surowicy krwi, który mógł się przyczyniać do oszacowanego wyższego stężenia wapnia w erytrocytach. Wyższe stężenie $1,25(OH)_2D_3$ u zwierząt karmionych paszą suplementowaną mogło być także przyczyną zwiększonej ilości i brzusznej lokalizacji gromadzonej tkanki tłuszczowej. Obserwowane zmiany adaptacyjne miały na celu utrzymanie stałego stężenia wapnia w osoczu krwi, które zostało zachowane nawet pomimo mniejszego spożycia i znacznego wzrostu wydalania wapnia z moczem przez zwierzęta żywione paszą suplementowaną.

Wyniki przeprowadzonych badań nie potwierdziły jednoznacznie hipotezy postawionej w celu pracy. Przyczynić się do tego mogła długość trwania doświadczenia. Dynamika przyrostów masy ciała, które mogły być jednym z czynników wpływających na badane parametry, wskazuje, że w grupie żywionej paszą zmodyfikowaną, tak niesuplementowaną, jak i suplementowaną, wykazywały one wzrostową tendencję w trakcie trwania doświadczenia. Być może wydłużenie czasu trwania eksperymentu pozwoliłoby na wyraźniejsze zaznaczenie zmian, między innymi w zawartości wapnia i magnezu w tkankach. Należy jednak pamiętać, że szczury należą do zwierząt szybko przystosowujących się do zmian środowiskowych i wydłużenie czasu doświadczenia mogłoby nasilić zmiany adaptacyjne, maskując efekty zastosowanych czynników.

Coraz częściej pojawiają się już jednak głosy, poparte uzyskiwanymi wynikami badań, podważające zasadność stosowania suplementacji jako powszechnej drogi do zachowania zdrowia, sprawności i urody. Alternatywą dla suplementów diety ma stać się żywność wzbogacana w wybrane składniki odżywcze. Dodawanie witamin i składników mineralnych do żywności stało się praktyką powszechną, nie zawsze podyktowaną chęcią produkowania żywności o charakterze funkcjonalnym i zapobiegającej niedoborom. W związku z dużą konkurencją na rynku żywności producenci często wytwarzają nowe jej typy, wzbogacając swoje produkty w składniki odżywcze, a fakt dodania do nich witamin i składników mineralnych jest podkreślany jako dodatkowy walor. Asortyment żywności wzbogacanej stale się rozszerza. Obecnie najczęściej wzbogaca się soki i napoje, przetwory zbożowe, mleko i przetwory mleczne oraz wyroby cukiernicze. Często są to produkty, w których kupujący nie spodziewa się obecności dodatkowej ilości witamin, np. słodkie napoje gazowane lub słodycze typu cukierki czy żelki. Żywność jest wzbogacana w witaminę C, witaminy z grupy B oraz witaminy A, D i E, a także w składniki mineralne, takie jak wapń, magnez, żelazo i jod. Znakowanie wszystkich wzbogaconych produktów spożywczych wartością odżywczą jest obowiązkowe, jednak wielu konsumentów nie czyta informacji umieszczonych na opakowa-

niach żywności. Problemem staje się więc często nieświadomy wybór przez konsumenta żywności wzbogacanej. Inaczej jest w przypadku suplementacji, która jest formą uzupełnienia diety w wybrane składniki wybieraną świadomie.

Ponieważ asortyment żywności wzbogacanej zwiększa się, rozszerza się też lista dodawanych składników, a producenci, ze względu na konieczność zachowania określonego składu produktów do końca terminu ich przydatności do spożycia, stosują duże naddatki technologiczne dodawanych składników, niezwykle aktualna staje się potrzeba analizy korzyści i zagrożeń wynikających ze stosowania w diecie żywności wzbogacanej, a pytanie dotyczące bezpieczeństwa jej stosowania pozostaje otwarte.

6. Wnioski

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że:

1. Zastosowana modyfikacja składu diety prowadziła do zmiany zawartości wapnia w tkankach, zwiększając jego zawartość w kości udowej, a zmniejszając w wątrobie.

2. Suplementacja paszy zmodyfikowanej wybranymi witaminami z grupy B spowodowała u badanych zwierząt wzrost wydalania wapnia z moczem, co wymusiło zmiany adaptacyjne w ustroju, polegające na wzroście stężenia 1,25-dihydroksycholekalcyferolu odpowiedzialnego za wchłanianie wapnia.

3. Zastosowana suplementacja przyczyniała się również do wzrostu stężenia wapnia w erytrocytach. Wzrost ten mógł wynikać z wyższego w tej grupie zwierząt stężenia czynnej formy witaminy D_3 oraz destabilizacji błony komórkowej, zwiększającej jej przepuszczalność. Odpowiedzią organizmu na wzrost stężnia wapnia w erytrocytach mógł być również obserwowany w nich wzrost stężenia magnezu, zapobiegającego nadmiernemu gromadzeniu wapnia w komórce.

4. Obserwowane u zwierząt żywionych paszą suplementowaną zwiększone gromadzenie tłuszczu krezkowego nasilającego reakcje wolnorodnikowe oraz większa synteza endogennej witaminy D_3 mogą się przyczyniać do dalszego gromadzenia tkanki tłuszczowej na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, który stymuluje lipogenezę i hamuje lipolizę.

5. Zakres zmian obserwowanych w gospodarce magnezem, zachodzących pod wpływem modyfikacji składu diety i jej suplementacji, był zdecydowanie mniejszy w porównaniu ze zmianami w gospodarce wapniem.

Piśmiennictwo

Akmal M., Perkins S., Kasim S.E., Oh H.Y., Smogorzewski M., Massry S.G. 1993. Verapamil prevents chronic renal failure-induced abnormalities in lipid metabolism. *Am. J. Kidney Dis*. 1(22): 158–163.

Albanes D., Heinonen O.P., Taylor P.R., Virtamo J., Edwards B.K., Rautalahti M., Hartman A.M., Palmgren J., Freedman L.S., Haapakoski J., Barrett M.J., Pietinen P., Malila N., Tala E., Liippo K., Salomaa E.R., Tangrea J.A., Teppo L., Askin F.B., Taskinen E., Erozan Y., Greenwald P., Huttunen J.K. 1996. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst*. 88(21): 1560–1570.

Andersen T., McNair P., Fogh-Andersen N., Nielsen T.T., Hyldstrup L., Transbol I. 1986. Increased parathyroid hormone as a consequence of changed complex binding plasma calcium in morbid obesity. *Metabolism* 35(2): 147–151.

Auwerx J., Bouillon R., Kesteloot H. 1992. Relation between 25-hydroxyvitamin D_3, apolipoprotein A-I, and high density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler. Thromb*. 12(6): 671–674.

Bar A., Cohen A., Eisner U., Risenfeld G., Hurwitz S. 1978. Differential response of calcium transport systems in laying hens to exogenous and endogenous changes in vitamin D status. *J. Nutr*. 108(8): 1322–1328.

Basso L.E., Ubbink J.B., Delport R. 2000. Erythrocyte magnesium concentration as an index of magnesium status: a perspective from a magnesium supplementation study. *Clin. Chim. Acta* 291(1): 1–8.

Begum N., Sussman K.E., Draznin B. 1992. Calcium-induced inhibition of phosphoserine phosphatase in insulin target cells is mediated by the phosphorylation and activation of inhibitor 1. *J. Biol. Chem*. 267(9): 5959–5963.

Bener A., Hammoudeh M., Zirie M., Heller R.F. 2005. Is obesity a protective factor for osteoporosis? *APLAR J. Reumatol*. 8(1): 32–38.

Berner H.S., Lyngstadaas S.P., Spahr A., Monjo M., Thommesen L., Drevon C.A., Syversen U., Reseland J.E. 2004. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 35(4): 842–849.

Bode E.F., Briston S.J., Overend C.L., O'Neill S.C., Trafford A.W., Eisner D.A. 2011. Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca content in rat ventricular myocytes. *J. Physiol*., doi: 10.1113/jphysiol.2011.211052.

Botella-Carretero J.I., Alvarez-Blasco F., Villafruela J.J., Balsa J.A., Vázquez C., Escobar-Morreale H.F. 2007. Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin. Nutr*. 26(5): 573–580.

Bougle D., Bouhallab S., Bureau F., Zunquin G. 2009. Effects of trace elements and calcium on diabetes and obesity, and their complications: Protective effect of dairy products – A mini-review. *Dairy Sci. Technol*. 89(6): 213–218.

Boyce B.F., Li P., Yao Z., Zhang Q., Badell I.R., Schwarz E.M., O'Keefe R.J., Xing L. 2005. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J. Med*. 54(3): 127–131.

Bredella M.A., Torriani M., Ghomi R.H., Thomas B.J., Brick D.J., Gerweck A.V., Harrington L.M., Breggia A., Rosen C.J., Miller K.K. 2011. Determinants of bone mineral density in obese premenopausal women. *Bone* 48(4): 748–754.

Brodeur M.R., Brissette L., Falstrault L., Ouellet P., Moreau R. 2008. Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic. Biol. Med*. 44(4): 506–517.

Broekmans W.M.R., Klöpping-Ketelaars I.A.A., Schuurman C.R., Verhagen H., van den Berg H., Kok F.J., van Poppel G. 2000. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J. Nutr*. 130(6): 1578–1583.

Brunner E.J., Rees K., Ward K., Burke M., Thorogood M. 2007. *Dietary advice for reducing cardiovascular risk*. The Cochrane Library. Issue 4. New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd: 1–87.

Burette A.C., Strehler E.E., Weinberg R.J. 2009. "Fast" plasma membrane calcium pump PMCA2a concentrates in GABAergic terminals in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol*. 512(4): 500–513.

Capiati D.A., Vazquez G., Tellez-Inon M.T., Boland R.L. 2000. Role of protein kinase C in 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) modulation of intracellular calcium during development of skeletal muscle cells in culture. *J. Cell. Biochem*. 77(2): 200–212.

Carbone L.D., Bush A.J., Barrow K.D., Kang A.H. 2003. The relationship of sodium intake to calcium and sodium excretion and bone mineral density of the hip in postmenopausal African-American and Caucasian women. *J. Bone Miner. Metab*. 21(6): 415–420.

Carpenter J.W., Mashima T.Y., Rupiper D.J. 2001. *Exotic animal formulary*. Philadelphia, W.B. Saudenders Company, ISBN-10: 0721683126, ISBN-13: 978-0721683126.

Carruth B., Skinner J., Coletta F. 1999. Dietary and anthropometric factors predicting body fat in preschool children. *Scand. J. Nutr*. 43 suppl.: 53S.

Chen C., Tong N., Ran X., Yang D. 2002. The relationship between obesity, intra-abdominal fat area and bone mineral density and bone strength. *J. Biomed. Eng*. 19: 471–475.

Chwojnowska Z., Charzewska J., Rogalska-Niedźwiedź M., Chabros E., Wajszczyk B., Ziemlański Ś. 1993. Ocena sposobu żywienia 70-letnich mieszkańców wybranej dzielnicy warszawskiej. *Żyw. Człow. Metab*. 20(3): 189–200.

Cole Z.A., Dennison E.M., Cooper C. 2008. Osteoporosis epidemiology update. *Curr. Rheumatol. Rep*. 10(2): 92–96.

Corradi D., Maestri R., Callegari S., Pastori P., Goldoni M., Luong T.V., Bordi C. 2004. The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc. Pathol*. 13(6): 313–316.

Creedon A., Cashman K.D. 2000. The effect of high salt and high protein intake on calcium metabolism, bone composition and bone resorption in the rat. *Br. J. Nutr*. 84(1): 49–56.

Czerwinski E., Kanis J.A., Trybulec B., Johansson H., Borowy P., Osieleniec J. 2009. The incidence and risk of hip fracture in Poland. *Osteoporos. Int*. 20(8): 1363–1367.

De Nijs R.N. 2008. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options. *Minerva Med*. 99(1): 23–43.

Delvin E.E., Lambert M., Levy E., O'Loughlin J., Mark S., Gray-Donald K., Paradis G. 2010. Vitamin D status is modestly associated with glycemia and indicators of lipid metabolism in French-Canadian children and adolescents. *J. Nutr*. 140(5): 987–991.

Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W. 1998. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Wrocław, Volumed: 604, 787, 790.

Demer L., Tintut Y. 2011. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor-κB signaling in atherosclerotic calcification. *Circ. Res*. 108(12): 1482–1493.

Despres J.P. 2006. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J. Endocrinol. Invest*. 29(3) suppl: 77–82.

Ding J., Hsu F.C., Harris T.B., Liu Y., Kritchevsky S.B., Szklo M., Ouyang P., Espeland M.A., Lohman K.K., Criqui M.H., Allison M., Bluemke D.A., Carr J.J. 2009. The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am. J. Clin. Nutr*. 90(3): 499–504.

Ding M., Danielsen C.C., Overgaard S. 2011. The effects of glucocorticoid on microarchitecture, collagen, mineral and mechanical properties of sheep femur cortical bone. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, doi: 10.1002/term.448.

Dodds R.A., Merry K., Littlewood A., Gowen M. 1994. Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem*. 42(6): 733–744.

Dontas I.A., Yiannakopoulos C.K. 2007. Risk factors and prevention of osteoporosis-related fractures. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact*. 7(3): 268–272.

Dumas A., Gaudin-Audrain C., Mabilleau G., Massin P., Hubert L., Basle´ M.F., Chappard D. 2006. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials* 27(23): 4204–4211.

Elin R.J., Utter A., Tan H.K., Corash L. 1980. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. *Am. J. Pathol*. 100(3): 765–778.

Elliott M.E., Goodfriend T.L. 1993. Mechanism of fatty acid inhibition of aldosterone synthesis by bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 132(6): 2453–2460.

Ertürk S., Kutlay S., Karabulut H.G., Keven K., Nergizoglu G., Ates K., Bokesoy I., Duman N. 2002. The impact of vitamin D receptor genotype on the management of anemia in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis*. 40(4): 816–823.

Fawcett W.J., Haxby E.J., Male D.A. 1999. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br. J. Anaesth*. 83(2): 302–320.

Fiebeler A., Luft F.C. 2005. The mineralocorticoid receptor and oxidative stress. *Heart Fail. Rev*. 10(1): 47–52.

Fine K.D., Santa Ana C.A., Porter J.L., Fordtran J.S. 1991. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J. Clin. Invest*. 88(2): 396–402.

Flynn A., Moreiras O., Stehle P., Fletcher R.J., Müller D.J.G., Rolland V. 2003. Vitamins and minerals: a model for safe addition to foods. *Eur. J. Nutr*. 42(2): 118–130.

Foltyn W., Kos-Kudła B., Siemińska L., Strzelczyk J., Kajdaniuk D., Marek B. 2003. Osteoporoza i miażdżyca – wspólna etiopatogeneza? *Endokrynol. Pol*. 54(3): 316–320.

Forouhi N.G., Luan J., Cooper A., Boucher B.J., Wareham N.J. 2008. Baseline serum 25-hydroxy-vitamin D is predictive of future glycemic status and insulin resistance. the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990–2000. *Diabetes* 57(10): 2619–2625.

Fraga C., Blanco M., Vigo E., Segura C., García-Caballero T., Pérez-Fernández R. 2002. Ontogenesis of the vitamin D receptor in rat heart. *Histochem. Cell. Biol*. 117(6): 547–550.

Frantseva M.V., Carlen P.L., Perez Velazquez J.L. 2001. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. *Free Radic. Biol. Med*. 31(10): 1216–1227.

Fried S.K., Bunkin D.A., Greenberg A.S. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: depot differences and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 83(3): 847–850.

Friedrich M. 1995. Effects of diet enrichment with glucose and casein on blood cortisol concentration of calves in early postnatal period. *Arch. Vet. Pol*. 35(1–2): 117–125.

Friedrich M. 1997. Prozdrowotna edukacja żywieniowa jako czynnik wpływający na zmiany nawyków żywieniowych. Cz. I. Ocena sposobu żywienia zawodowo pracujących mieszkanek Szczecina, w wieku 45–52 lat, z BMI ≥ 30 i ≥ 40. *Żyw. Człow. Metab*. 24(3): 279–292.

Friedrich M. 2004. Effect of dietary carbohydrate source and type on the concentrations of lipolysis enhancing hormones in rats. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 54(2): 209–214.

Friedrich M., Dolot A. 2009. Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation on free radical-related process in the body. Contents of non-enzymatic components of antioxidation defence and lipid peroxidation products in rat tissues. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 59(3): 255–263.

Friedrich M., Dolot A. 2010. Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation in free radical-related processes in the body. Activity of antioxidant enzymes and the total antioxidant status of rat blood. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 60(3): 281–287.

Friedrich M., Goluch-Koniuszy Z. 2007. Wpływ składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na stężenie lipidów i lipoprotein we krwi szczura. *Żyw. Człow. Metab*. 34(3/4): 1052–1057.

Friedrich M., Goluch-Koniuszy Z. 2009. Ocena wpływu składu diety i jej suplementacji wybranymi witaminami z grupy B na stężenie lipidów i lipoprotein we krwi samic szczura. *Rocz. Państw. Zakł. Hig*. 60(1): 91–95.

Friedrich M., Sadowska J. 2005a. Effects of diet supplementation with B-complex vitamins on fatty tissue accumulation in rats. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 55(2): 189–194.

Friedrich M., Sadowska J. 2005b. Wpływ składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na ilość i skład kwasów tłuszczowych okołonarządowej tkanki tłuszczowej u szczura. *Żyw. Człow. Metab*. 32(4): 302–315.

Friedrich M., Sadowska J. 2008. Wpływ składu i suplementacji diety wybranymi witaminami z grupy B na ilość i lokalizację tkanki tłuszczowej oraz stężenia lipidów we krwi szczura. *EJPAU Food Science and Technology* 11(3) # 09.

Friedrich M., Sadowska J., Goluch-Koniuszy Z. 2009. Ocena wpływu składu diety i jej uzupełniania witaminami z grupy B na stężenie insuliny i wybranych wskaźników przemian białkowych u samic szczura. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4(65): 361–367.

Friedrich M., Sadowska J., Sawicka A. 2005. The effect of supplementing the diet with B vitamins on the composition of fatty acids in a fat tissue of peri-organs and on the processes of fatty acid peroxidation in rat. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4(45) supl.: 139–150.

Friedrich M., Sadowska J., Sawicka A. 2007. Wpływ składu diety i rodzaju jej suplementacji witaminami z grupy B na metabolizm ustroju szczura. W: *60-letni dorobek nauki na Pomorzu Zachodnim wnoszony do Unii Europejskiej. Nauki Przyrodnicze*. II Zachodniopomorski Kongres Nauki. Szczecin, Szczecińskie Towarzystwo Naukowe, Akademia Rolnicza w Szczecinie: 21–36.

Friedrich M., Sadowska J., Serwotka J. 2002. The influence of uncontrolled supplementation of the diet with vitamins and minerals on dynamics, fodder consumption and body mass gain in rats. *Folia Univ. Agric. Stetin. Scientia Alimentaria* 228(2): 3–12.

Fuller K., Kirstein B., Chambers T.J. 2007. Regulation and enzymatic basis of bone resorption by human osteoclasts. *Clin. Sci. (Lond)* 112(11): 567–575.

Galic S., Oakhill J.S., Steinberg G.R. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316(2): 129–139.

Gałecka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałecki P. 2008. Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii. *Pol. Merk. Lek*. 24(143): 446–448.

Giovannucci E., Liu Y., Hollis B.W., Rimm E.B. 2008. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch. Intern. Med*. 168(11): 1174–1180.

Goff J.P., Reinhardt T.A., Beckman M.J., Horst R.L. 1990. Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)2D] versus endogenous 1,25-(OH)2D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* 126(2): 1031–1035.

Goluch-Koniuszy Z., Sadowska J., Wierzbicka A. 2011. An assessment of the influence of B group vitamins on the C-reactive protein concentration and chosen indicators of protein metabolism in male rats. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 10(3): 387–397.

Goluch-Koniuszy Z., Wierzbicka A. 2011. Appreciation of concentration of lipoproteins and apolipoproteins in serum of male rats under the influence of diet change composition and its supplementation with group B vitamins. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 10(1): 109–121.

Goodfriend T.L., Lee W.M., Ball D.L., Elliott M.E. 1995. Specificity and mechanism of fatty acid inhibition of aldosterone secretion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52(2–3): 145–149.

Greensmith D.J., Eisner D.A., Nirmalan M. 2010. The effects of hydrogen peroxide on intracellular calcium handling and contractility in the rat ventricular myocyte. *Cell Calcium* 48(6): 341–351.

Gronowska-Senger A., Drywień M., Hamułka M. 1998. Analiza stanu żywienia dzieci w wieku w przedszkolnym i szkolnym w oparciu o istniejące piśmiennictwo z lat 1980–1995. *Rocz. Państw. Zakł. Hig*. 49(3): 337–383.

Guerin C., Cousin C., Mignot F., Manchon M., Fournier G. 1996. Serum and erythrocyte magnesium in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 22(8): 724–727.

Günther T. 2006. Mechanisms, regulation and pathologic significance of Mg^{2+} efflux from erythrocytes. *Magnes. Res*. 19(3): 190–198.

Halade G.V., Rahman M.M., Williams P.J., Fernandes G. 2010. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. *J. Nutr. Biochem*. 21(12): 1162–1169.

Harris S., Dallal G., Dawson-Hughes B. 1992. Influence of body weight on rates of change in bone density of the spine, hip and radius in postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int*. 50(1): 19–23.

Harrison R.A., Holt D., Pattison D.J., Elton P.J. 2004. Are those in need taking dietary supplements? A survay of 21 923 adults. *Br. J. Nutr*. 91(4): 617–623.

Hauner H. 2005. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc*. 64(2): 163–169.

Henley C., Colloton M., Cattley R.C., Shatzen E., Towler D.A., Lacey D., Martin D. 2005. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol. Dial. Transplant*. 20(7): 1370–1377.

Higashi-Okai K., Nagino H., Yamada K., Okai Y. 2006. Antioxidant and prooxidant activities of B group vitamins in lipid peroxidation. *J. UOEH* 28(4): 359–368.

Hjelmesaeth J., Hofsø D., Aasheim E.T., Jenssen T., Moan J., Hager H., Røislien J., Bollerslev J. 2009. Parathyroid hormone, but not vitamin D, is associated with the metabolic syndrome in morbidly obese women and men: a cross-sectional study. *Cardiovasc. Diabetol*. 3(8): 7.

Hofmanova J., Zadak Z., Hyspler R., Mikeska J., Zdansky P., Vaculova A., Neticova J., Kozubik A. 2005. The effects of parenteral lipid emulsions on cancer and normal human colon epithelial cells in vitro. *Physiol. Res*. 54(4): 409–418.

Holecki M., Zahorska-Markiewicz B., Nieszporek T., Mizia-Stec K., Żak-Gołąb A., Kocełak P., Olszanecka-Glinianowicz M., Więcek A. 2006. Selected parameters of bone turnover in obese perimenopausal women. *Ann. Acad. Med. Siles*. 2: 126–129.

Holecki M., Zahorska-Markiewicz B., Nieszporek T., Olszanecka-Glinianowicz M., Mizia-Stec K., Żak-Gołąb A., Kocełak P., Fryźlewicz-Moska A., Wiecek A. 2005. Impact of the mass-reductive therapy with orlistat on 25-(OH)-D3 and PTH concentration in sera of obese, menopausal women. *Endokrynol. Pol*. 56(3): 240–245.

Holecki M., Zahorska-Markiewicz B., Więcek A., Nieszporek T., Żak-Gołąb A. 2008. Otyłość a metabolizm kości. *Endokrynol. Pol*. 59(3): 218–223.

Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 257(5091): 87–91.

Hoyland J.A., Mee A.P., Baird P., Braidman I.P., Mawer E.B., Freemont A.J. 1997. Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone* 20(2): 87–92.

Huang H.Y., Caballero B., Chang S., Alberg A., Semba R., Schneyer C., Wilson R.F., Cheng T.Y., Prokopowicz G., Barnes II G.J., Vassy J., Bass E.B. 2006. *Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease.* Evidence report/technology assessment no. 139. Prepared by The Johns Hopkins University Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-02-0018. AHRQ Publication No. 06-E012. Rockville, MD, Agency for Healthcare Research and Quality.

Huijgen H.J., Soesan M., Sanders R., Mairuhu W.M., Kesecioglu J., Sanders G.T. 2000. Magnesium levels in critically ill patients. What should we measure? *Am. J. Clin. Pathol*. 114(5): 688–695.

IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthopho-sphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). 1983. *Clin. Chim. Acta*: 339F–367F.

IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ-glutamyltransferase [(γ-glutamyl)-peptide: amino acid γ-glutamyltransferase (GGT), EC 2.3.2.2]. 2002. *Clin. Chem. Lab. Med*. 40: 734–738.

Izzotti A., Bagnis A., Sacca S.C. 2006. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat. Res*. 612(2): 105–114.

Jabłecka A., Korzeniowska K., Skołuda A., Cieślewicz A. 2011. Preparaty magnezu. *Farm. Współ.* 4: 29–32.

James M.F. 1992. Clinical use of magnesium infusions in anesthesia. *Anesth. Analg*. 74(1): 129–136.

Jantarska D., Ratkovska B., Kunachowicz H. 2007. Wzbogacanie żywności – wartości deklarowane a rzeczywiste. *Przem. Spoż*. 61(1): 24–27.

John J.H., Ziebland S., Yudkin P., Roe L.S., Neil H.A. 2002. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet* 359(9322): 1969–1974.

Johnell O., Kanis J.A. 2004. An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture. *Osteoporos. Int*. 15(11): 897–902.

Johnell O., Kanis J.A. 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporosis fractures. *Osteoporos. Int*. 17(12): 1726–1733.

Jorde R., Figenschau Y., Moira Hutchinson M., Emaus N., Grimnes G. 2010. High serum 25-hydroxy-vitamin D concentrations are associated with a favourable serum lipid profile. *Eur. J. Clin. Nutr*. 64(12): 1457–1464.

Jurimae J., Rembel K., Jurimae T., Rehand M. 2005. Adiponectin is associated with bone mineral density in perimenopausal women. *Horm. Metab. Res*. 37(5): 297–302.

Kałuża J., Bagan A., Brzozowska A. 2004. Ocena udziału witamin i składników mineralnych z suplementów w diecie osób starszych. *Rocz. Państw. Zakł. Hig*. 22(1): 51–61.

Kapelański W., Topoliński T., Grajewska S., Bocian M., Jankowiak H. 2011. Bone strength (*ossis tibiae*) of native pigs złotnicka spotted breed and crossbreds of polish large white and polish landrace pigs. *J. Cent. Eur. Agric*. 12(4): 542–556, doi: 10.5513/jcea01/12.4.952

Kobayashi K., Takahashi N., Jimi E., Udagawa N., Takami M., Kotake S., Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Morinaga T., Higashio K., Martin T.J., Suda T. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med*. 191(2): 275–286.

Kokot F. 2005. *Gospodarka wodno-elektrolitowa i kwasowo-zasadowa w stanach fizjologii i patologii*. Warszawa, Wydaw. Lek. PZWL: 157.

Kolmaga A., Godala M., Trafalska E. 2009. Ocena podaży witamin i składników mineralnych z dietą i suplementami diety w grupie dzieci 12-13 letnich z łódzkich szkół. *Żyw. Człow. Metab*. 36(1): 40–47.

Kołłątaj W., Szewczyk L. 2006a. Gospodarka wapniowa. Regulacja gospodarki wapniowej. *Endokrynol. Ped*. 5(1): 49–55.

Kołłątaj W., Szewczyk L. 2006b. Gospodarka wapniowa – rola wapnia w organizmie ludzkim. *Endokrynol. Ped*. 5(1): 57–61.

Kontogianni M.D., Dafni U.G., Routsias J.G., Skopouli F.N. 2004. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J. Bone Miner. Res*. 19(4): 546–551.

Kozielec T., Karakiewicz B., Chlubek D., Noceń I. 2006. Influence of taking drugs on selected bioelements concentration by the erythrocyte, serum and urine analysis in psychoactive drugs users. *Fam. Med. Prim. Care Rev*. 8(2): 278–284.

Kozioł-Kozakowska A., Piórecka B., Jagielski P., Schlegel-Zawadzka M. 2009. Suplementacja diety preparatami witaminowo-mineralnymi wśród dzieci w wieku przedszkolnym w Krakowie. *Żyw. Człow. Metab*. 36(1): 12–18.

Kozyrska J., Januszko O., Urbańska A., Pietruszka B. 2010. Charakterystyka stosowania suplementów i produktów wzbogaconych w witaminy i składniki mineralne u dzieci w wieku 7–12 lat. *Probl. Hig. Epidemiol*. 91(4): 549–555.

Kunachowicz H., Troszczyńska A. 2005. Żywność wzbogacana i suplementy witaminowo-mineralne a ich rola w prawidłowej diecie człowieka. *Now. Lek*. 74(4): 533–538.

Lagunova Z., Porojnicu A.C., Lindberg F., Hexeberg S., Moan J. 2009. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res*. 29(9): 3713–3720.

Lagunova Z., Porojnicu A.C., Vieth R., Lindberg F.A., Hexeberg S., Moan J. 2011. Serum 25-hydroxy-vitamin D is a predictor of serum 1,25-dihydroxyvitamin D in overweight and obese patients. *J. Nutr*. 141(1): 112–117.

Larsen K. 1972. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. *Clin. Chim. Acta* 41: 209–217.

Lavie C.J., Milani R.V., Ventura H.O. 2009. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J. Am. Coll. Cardiol*. 53(21): 1925–1932.

Lenarcik A., Bidzińska-Speichert B., Bednarek-Tupikowska G. 2006. Hiperkalcemia jako objaw współistnienia pierwotnej nadczynności przytarczyc i szpiczaka plazmocytowego. *Adv. Clin. Exp. Med*. 15(1): 211–215.

Lenders C.M., Feldman H.A., Von Scheven E., Merewood A., Sweeney C., Wilson D.M., Lee P.D., Abrams S.H., Gitelman S.E., Wertz M.S., Klish W.J., Taylor G.A., Chen T.C., Holick M.F. 2009. Relation of body fat indexes to vitamin D status and deficiency among obese adolescents. *Am. J. Clin. Nutr*. 90(3): 459–467.

Leppala J., Virtamo J., Fogelholm R., Huttunen J., Albanes D., Taylor P.R., Heinonen O.P. 2000. Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 20(1): 230–238.

Li K.C., Zernicke R.F., Barnard R.J., Li A.F. 1990. Effects of a high fat sucrose diet on cortical bone morphology and biomechanics. *Calcif. Tissue Int*. 47(5): 308–313.

Lobo A.R., Filho J.M., Alvares E.P., Cocato M.L., Colli C. 2009. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. *Nutrition* 25(2): 216–225.

Lopez I., Mendoza F.J., Aguilera-Tejero E., Perez J., Guerrero F., Martin D., Rodriguez M. 2008. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 73(3): 300–307.

Lorincz C., Reimer R.A., Boyd S.K., Zernicke R.F. 2010. High-fat, sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. *Br. J. Nutr*. 103(9):1302–1308.

Lu L., Yu Z., Pan A., Hu F.B., Franco O.H., Li H., Li X., Yang X., Chen Y., Lin X. 2009. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and metabolic syndrome among middle-aged and elderly Chinese individuals. *Diabetes Care* 32(7): 1278–1283.

Majumdar P., Boylan L.M. 1989. Alteration of tissue magnesium levels in rats by dietary vitamin B_6 supplementation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 59(3): 300–303.

Malon A., Brockmann C., Fijalkowska-Morawska J., Rob P., Maj-Żurawska M. 2004. Ionized magnesium in erythrocytes – the best magnesium parameter to observe hypo- or hypermagnesemia. *Clin. Chim. Acta* 349(1–2): 67–73.

Marchington J.M., Mattacks C.A., Pond C.M. 1989. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, fetal development and biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 94(2): 225–232.

Marcinowska-Suchowierska E. 2002. Aktualny stan wiedzy o diagnostyce osteoporozy i czynnikach ryzyka złamań w przebiegu osteoporozy. *Post. Nauk Med*. 4: 159–164.

Marcinowska-Suchowierska E., Lisawa A., Marowska J., Lorencewicz Z., Tałałaj M., Brzozowski R., Lorenc R. 1992. Biochemiczne markery przebudowy kości i ich przydatność do diagnostyki osteoporozy. *Wiad. Lek*. 45(17–18): 647–654.

Mardon J., Habauzit V., Trzeciakiewicz A., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Tressol J.C., Horcajada M.N., Demigné C., Coxam V. 2008. Long-term intake of a high-protein diet with or without potassium citrate modulates acid-base metabolism, but not bone status, in male rats. *J. Nutr*. 138(4): 718–724.

Marenzana M., Shipley A.M., Squitiero P., Kunkel J.G., Rubinacci A. 2005. Bone as an ion exchange organ: evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. *Bone* 37(4): 545–554.

Marks S.C., Popoff S.N. 1990. Ultrastructural biology and pathology of the osteoclasts. In: *Ultrastructure of skeletal tissues. Bone and cartilage in health and dissease*. Eds E. Bonucci, P.M. Motto. Boston–Dortrecht–London, Kulwer Academic Publishers: 239–252.

Martini L.A., Wood R.J. 2006. Vitamin D status and the metabolic syndrome. *Nutr. Rev*. 64(11): 479–486.

Massry S.G., Fadda G.Z. 1993. Chronic renal failure is a state of cellular calcium toxicity. *Am. J. Kidney Dis*. 21(1): 81–86.

Masuzaki H., Paterson J., Shinyama H., Morton N.M., Mullins J.J., Seckl J.R., Flier J.S. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294(5549): 2166–2170.

Masuzaki H., Yamamoto H., Kenyon C.J., Elmquist J.K., Morton N.M., Paterson J.M., Shinyama H., Sharp M.G., Fleming S., Mullins J.J., Seckl J.R., Flier J.S. 2003. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J. Clin. Invest*. 112(1): 83–90.

Mayne C.G., Spanier J.A., Relland L.M., Williams C.B., Hayes C.E. 2011. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol*. 41(3): 822–832.

McCarron D.A., Morris C.D., Henry H.J., Stanton J.L. 1984. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 224(4656): 1392–1398.

McCarty M.F., Thomas C.A. 2003. PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight. *Med. Hypotheses* 61(5/6): 535–542.

Morberg C.M., Tetens I., Black E., Toubro S., Soerensen T.I., Pedersen O., Astrup A. 2003. Leptin and bone mineral density: a cross-sectional study in obese and nonobese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 88(12): 5795–5800.

Morris K.L., Zemel M.B. 2005. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes. Res*. 13(4): 670–677.

Mosekilde L., Melsen F., Hessov I., Christensen M.S., Lund B.J., Lund B.I., Sørensen O.H. 1980. Low serum levels of 1,25 dihydroxyvitamin D and histomorphometric evidence of osteomalacia after jejunostomy bypass for obesity. *Gut* 21(7): 624–631.

Murphy S.P., Wilkens L.R., Monroe K.R., Steffen A.D., Yonemori K.M., Morimoto Y., Albright C.L. 2011. Dietary supplement use within a multiethnic population as measured by a unique inventory method. *J. Am. Diet. Assoc*. 111(7): 1065–1072.

Murray C.J.L., Salomon J.A., Mathers C.D., Lopez A.D. 2002. *Summary measures of population health: concepts, ethics, measurement and applications*. Geneva, WHO, ISBN 9241545518.

Negri A.L., Barone R., Bogado C.E., Zanchetta J.R. 2005. Relationship between weight, body composition, and bone mass in peritoneal dialysis. *Nefrologia* 25(3): 269–274.

New S.E., Aikawa E. 2011. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ. Res*. 108(11): 1381–1391.

Nielsen F.H. 2006. A mild magnesium deprivation affects calcium excretion but not bone strength and shape, including changes induced by nickel deprivation, in the rat. *Biol. Trace Elem. Res*. 110(2): 133–150.

Nijjar P.S., Burke F.M., Bloesch A., Rader D.J. 2010. Role of dietary supplements in lowering low--density lipoprotein cholesterol: A review. *J. Clin. Lipidol*. 4(4): 248–258.

Nowak L. 1995. Sytuacja demograficzna ludzi starszych w Polsce w perspektywie do 2010 roku. *Gerontol. Pol*. 3(3/4): 11–14.

Nutrient requirements of laboratory animals. 1995. Fourth revised ed. Washington, National Academy Press. 1995, ISBN-10: 0-309-05126-6, ISBN-13: 978-0-309-05126-2.

Oh K.W., Lee W.Y., Rhee E.J. Baek K.H., Yoon K.H., Kang M.I., Yun E.J., Park C.Y., Ihm S.H., Choi M.G., Yoo H.J., Park S.W. 2005. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 63(2): 131–138.

Okada Y., Morimoto I., Ura K., Watanabe K., Eto S., Kumegawa M., Raisz L., Pilbeam C., Tanaka Y. 2002. Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25$(OH)_2D_3$, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr. J*. 49(4): 483–495.

Olusi S.O. 2002. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotectic enzymes in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 26(9): 1159–1164.

Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meyskens F.L., Valanis B., Williams J.H., Barnhart S., Hammar S. 1996. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med*. 334(18): 1150–1155.

Orrell D.H. 1971. Albumin as an aid to the interpretation of serum calcium. *Clin. Chim. Acta* 35(2): 483–489.

Parhami F., Morrow A.D., Balucan J., Leitinger N., Watson A.D., Tintut Y., Berliner J.A., Demer L.L. 1997. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 17(4): 680–687.

Park S.Y., Murphy S.P., Wilkens L.R., Henderson B.E., Kolonel L.N. 2011. Multivitamin use and the risk of mortality and cancer incidence: the multiethnic cohort study. *Am. J. Epidemiol*. 173(8): 906–914.

Pasco J.A., Henry M.J., Kotowicz M.A., Collier G.R., Ball M.J., Ugoni A.M., Nicholson G.C. 2001. Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86(5): 1884–1887.

Perez Velazquez J.L., Frantseva M.V., Carlen P.L. 1997. In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hipocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci*. 17(23): 9085–9094.

Picotto G. 2001. Rapid effects of calciotropic hormones on female rat enterocytes: combined actions of 1,25$(OH)_2$-vitamin D_3, PTH and 17beta-estradiol on intracellular Ca^{2+} regulation. *Horm. Metab. Res*. 33(12): 733–738.

Pittas A.G., Lau J., Hu F.B., Dawson-Hughes B. 2007. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 92(6): 2017–2029.

PN-75/A-04018. *Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko*.

PN-ISO 1442:2000. *Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości wody (metoda odwoławcza)*.

PN-ISO 2171:1994. *Ziarno zbóż i przetwory zbożowe. Oznaczanie popiołu całkowitego*.

PN-ISO 5498:1996. *Produkty rolno-spożywcze*. *Oznaczanie zawartości włókna surowego. Metoda ogólna*.

PN-ISO 6492:2005. *Pasze. Oznaczanie zawartości tłuszczu.*

Poole K.E., Reeve J. 2005. Parathyroid hormone – a bone anabolic and catabolic agent. *Curr. Opin. Pharmacol*. 5(6): 612–617.

Prentice A. 2004. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutr*. 7(1A): 227–243.

Rapola J.M., Virtamo J., Ripatti S., Huttunen J.K., Albanes D., Taylor P.R., Heinonen O.P. 1997. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 349(9067): 1715–1720.

Ratkovska B., Kunachowicz H., Przygoda B. 2007. Krajowy rynek produktów wzbogaconych w witaminy i składniki mineralne wobec wymagań prawnych UE. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 55(6): 90–99.

Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr*. 123(11): 1939–1951.

Richart T., Thijs L., Nawrot T., Yu J., Kuznetsova T., Balkestein E.J., Struijker-Boudier H.A., Staessen J.A. 2011. The metabolic syndrome and carotid intima-media thickness in relation to the parathyroid hormone to 25-OH-D(3) ratio in a general population. *Am. J. Hypertens*. 24(1): 102–109.

Riggs B.L. 2000. The mechanism of estrogen regulation of bone resorption. *J. Clin. Invest*. 106(10): 1203–1204.

Rjavashisth T.B., Yamada H., Mishra N.K. 1995. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factorkappa B. *Arteriosler. Thromb. Vasc. Biol*. 15(10): 1591–1598.

Rock C.L. 2007. Multivitamin-multimineral supplements: who uses them? *Am. J. Clin. Nutr*. 85(1): 277S–279S.

Rodkey F.L. 1965. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem*. 11: 478–487.

Rodriguez-Rodriguez E., Ortega R.M., Gonzalez-Rodriguez L.G., Lopez-Sobaler A. 2011. Vitamin D deficiency is an independent predictor of elevated triglycerides in Spanish school children. *Eur. J. Nutr*. 50(5): 373–378.

Romagnoli E., Minisola G., Carnevale V., Scillitani A., Frusciante V., Aliberti G., Minisola S. 1998. Assessment of serum total and bone alkaline phosphate measurement in clinical practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36(3): 163–168.

Rubinacci A., Covini M., Bisogni C., Villa I., Galli M., Palumbo C., Ferretti M., Muglia M.A., Marotti G. 2002. Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 282(4): E851–E864.

Runhaar J., Koes B.W., Clockaerts S., Bierma-Zeinstra S.M. 2011. A systematic review on changed biomechanics of lower extremities in obese individuals: a possible role in development of osteoarthritis. *Obes Rev*., doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00916.x

Rusińska A., Chlebna-Sokół D., Lewiński A., Golec J., Woźniak E., Zygmunt A. 2007. Ocena zależności między densytometrycznymi i ultradźwiękowymi wskaźnikami gospodarki mineralnej kości a występowaniem złamań u dzieci. *Prz. Pediatr*. 37(4): 369–376.

Russell M., Mendes N., Miller K.K., Rosen C.J., Lee H., Klibanski A., Misra M. 2010. Visceral fat is a negative predictor of bone densitymeasures inobese adolescent girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 95(3): 1247–1255.

Ryżko J. 2001. Gospodarka wapniowo-fosforanowa w stanach fizjologii i patologii układu pokarmowego. *Pediatr. Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka* 3(2): 111–117.

Rządowa Rada Ludnościowa. 2004. *Sytuacja demograficzna Polski. Raport 2003*. Warszawa.

Sadowska J. 2002. *Wpływ suplementacji przetworzonej diety witaminami na przemiany węglowodanowo-lipidowe u szczura*. Rozprawa doktorska. AR Szczecin, maszynopis.

Sadowska J. 2004. Ocena wpływu różnych rodzajów suplementacji paszy witaminami na zmiany masy ciała i składu chemicznego tkanki mięśniowej szczura. *Folia Univ. Agric. Stetin. Scientia Alimentaria* 238(3): 91–100.

Sadowska J., Serwotka J. 2001. Wpływ kontrolowanej suplementacji diety wybranymi witaminami na niektóre składniki i enzymy przemian białkowych we krwi i tkankach szczura. *Folia Univ. Agric. Stetin. Scientia Alimentaria* 220(1): 65–72.

Sadowska J., Śliwińska U. 2005. Ocena sposobu żywienia i stanu odżywienia osób w wieku starszym, zamieszkałych na terenach wiejskich. *Żyw. Człow. Metab*. 32(3): 302–315.

Sage A.P., Lu J., Atti E., Tetradis S., Ascenzi M.G., Adams D.J., Demer L.L., Tintut Y. 2011. Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. *J. Bone Miner. Res*. 26(6): 1197–1206.

Saran A., Duda G. 2009. Wpływ wybranych czynników na zakup i stosowanie przez osoby starsze witaminowo-mineralnych suplementów diety. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 65(4): 271–277.

Saris N-E.L., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A. 2000. Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin. Chim. Acta* 294(1–2): 1–26.

Segura C., Alonso M., Fraga C., García-Caballero T., Diéguez C., Pérez-Fernández R. 1999. Vitamin D receptor ontogenesis in rat liver. *Histochem. Cell Biol*. 112(2): 163–167.

Shah N., Roux F. 2009. The relationship of obesity and obstructive sleep apnea. *Clin. Chest. Med*. 30(3): 455–465.

Shi H., Norman A.W., Okamura W.H., Sen A., Zemel M.B. 2001. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D_3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB J*. 15(14): 2751–2753.

Skinner J., Carruth B., Coletta F. 1999. Does dietary calcium have a role in body fat mass accumulation in young children. *Scand. J. Nutr*. 43 suppl.: 45S.

Stephens N.G., Parsons A., Schofield P.M., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson M.J. 1996. Randomised controled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347(9004): 781–786.

Sun X., Zemel M.B. 2007. 1α,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obesity* 15(8): 1944–1953.

Sunyer T., Lewis J., Collin-Osdoby P., Osdoby P. 1999. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells. *J. Clin. Invest*. 103(10): 1409–1418.

Szpak A., Pietrewicz M., Rybaczuk M., Ołtarzewska M. 1997. Ocena spożycia żywności i sposobu żywienia w okresie 9-letniej obserwacji populacji mężczyzn w wieku 35–44 lat w regionie północno-wschodnim Polski. *Żyw. Człow. Metab*. 24(4): 461–472.

Szpetnar M., Pasternak K. 2000. Wpływ suplementacji magnezowej na stężenie magnezu i wapnia oraz aktywność aminotransferaz w surowicy krwi i tkankach szczurów. *Biul. Magnezol*. 5(2): 96–102.

Szponar L., Walkiewicz A., Traczyk I. 2003. Rynek żywności ogólnego spożycia wzbogaconej w witaminy i składniki mineralne dopuszczonej do obrotu w Polsce w latach 1995–2001. *Bromat. Chem. Toksykol*. 36(3): 193–197.

Śliwa E., Studziński T., Tatara M.A. 2006. Glikokortykoidy a metabolizm i wzrost kości. *Med. Wet*. 62(4): 377–379.

Taylor J.R. 1997. *An introduction to error analysis. The study of uncertainties in physical measurements*. 2 ed. Susalito, California, University Science Books: 200–202.

Teegarden D., Lin Y.C., Weaver C.M., Lyle R.M., McCabe G.P. 1999. Calcium intake relates to change in body weight in young women (Abstract). *FASEB J*. 13: A873.

The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. 1994. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med*. 330(15): 1029–1035.

Thommesen L., Stunes A.K., Monjo M., Grøsvik K., Tamburstuen M.V., Kjøbli E., Lyngstadaas S.P., Reseland J.E., Syversen U. 2006. Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. *J. Cell Biochem*. 99(3): 824–834.

Tietz N.W. 1999. *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. Philadelphia, Saunders Co., ISBN-10: 093570275X, ISBN-13: 978-0935702750.

Tjaderhane L., Larmas M. 1998. A high sucrose diet decreases the mechanical strength of bones in growing rats. *J. Nutr*. 128(10): 1807–1810.

Tomofuji T., Yamamoto T., Tamaki N., Ekuni D., Azuma T., Sanbe T., Irie K., Kasuyama K., Umakoshi M., Murakami J., Kokeguchi S., Morita M. 2009. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *J. Periodontol*. 80(8): 1324–1329.

Trafalska E., Grzybowski A. 2009. Trendy w spożyciu suplementów przez studentów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. *Żyw. Człow. Metab*. 36(1): 48–54.

Turner R.T., Riggs B.L., Spelsberg T.C. 1994. Skeletal effects of estrogen. *Endocr. Rev*. 15(3): 275–300.

Ulatowska-Szostak E. 2008. Wpływ reklamy na zakup leków, parafarmaceutyków i preparatów witaminowych w opiniach klientów aptek – porównanie lat 2002 i 2007. *Probl. Hig. Epidemiol*. 89(3): 441–444.

Ustawa z dnia 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt. *DzU* z 1997 r., nr 111, poz. 724.

Van Soest P.J., Wine R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fibre residues in low nitrogen content. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 50: 50–55.

Wallerius S., Rosmond R., Ljung T., Holm G., Björntorp P. 2003. Rise in morning saliva cortisol is associated with abdominal obesity in men: a preliminary report. *J. Endocrinol. Invest*. 26(7): 616–619.

Wang W., Li C., Kwon T.H., Miller R.T., Knepper M.A., Frøkiaer J., Nielsen S. 2003. Reduced expression of renal Na^+ transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 286(3): F534–F545.

Wang X.B., Zhao X.H. 1998. The effect of dietary sulfur-containing amino acids on calcium excretion. *Adv. Exp. Med. Biol*. 442: 495–499.

Watson W.S., Lyon T.D., Hilditch T.E. 1980. Red cell magnesium as a function of cell age. *Metabolism* 29(5): 397–399.

Wawrzyniak A., Hamułka J., Michalczuk A. 2009. Udział suplementów w spożyciu witamin przez dzieci w wieku szkolnym. *Żyw. Człow. Metab*. 36(1): 19–24.

Wieleba E., Pasternak K., Brzozowski I., Dardzińska I., Kotowska I. 2001. Changes in serum and erythrocitary magnesium concentrations in sportsmen after physical exercise. *Biul. Magnezol*. 6(3): 396–404.

Wierzbicka E., Brzozowska A., Roszkowski W. 1997. Sposób żywienia oraz stan odżywienia ludzi starszych w Polsce w świetle danych z piśmiennictwa z lat 1980–1996. *Rocz. Państw. Zakł. Hig*. 48(1): 87–101.

Wolf F.I., Torsello A., Fasanella S., Cittadini A. 2003. Cell physiology of magnesium. *Mol. Aspects Med*. 24(1–3): 11–26.

Xiao Y., Cui J., Shi Y.H., Sun J., Wang Z.P., Le G.W. 2010. Effects of duodenal redox status on calcium absorption and related genes expression in high-fat diet-fed mice. *Nutrition* 26(11/12): 1188–1194.

Xiaoyu Z., Payal B., Melissa O., Zanello L.P. 2007. 1 alpha, $25(OH)_2$-vitamin D_3 membrane-initiated calcium signaling modulates exocytosis and cell survival. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*. 103(3–5): 457–461.

Xue B., Greenberg A.G., Kraemer F.B., Zemel M.B. 2001. Mechanism of intracellular calcium ([Ca2+]i) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J*. 15(13): 2527–2529.

Zalesin K.C., Franklin B.A., Miller W.M., Peterson E.D., McCullough P.A. 2011. Impact of obesity on cardiovascular disease. *Med. Clin. North. Am*. 95(5): 919–937.

Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M., Hewison M. 2001. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1a-hydroxylase. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86(2): 888–894.

Zemel M.B. 2001. Calcium modulation of hypertension and obesity: mechanisms and implications. *J. Am. Coll. Nutr*. 20(5): 428S–435S.

Zemel M.B., Shi H., Greer B., Dirienzo D., Zemel P.C. 2000. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J*. 14(4): 1132–1138.

Zernicke R.F., Salem G.J., Barnard R.J., Schramm E. 1995. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone* 16(1): 25–31.

Zillikens M.C., Uitterlinden A.G., van Leeuwen J.P., Berends A.L., Henneman P., van Dijk K.W., Oostra B.A., van Duijn C.M., Pols H.A., Rivadeneira F. 2010. The role of body mass index, insulin, and adiponectin in the relation between fat distribution and bone mineral density. *Calcif. Tissue Int*. 86(2): 116–125.

Zilva J.F., Pannall P.R. 1979. Plasma Enzymes in Diagnostics. In: *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*. Ed. E. Mayne. London, Lloyd: 15, 343.

Zino S., Skeaff M., Williams S., Mann J. 1997. Randomized controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants. *Br. Med. J*. 314(7097): 1787–1791.

Assessment of the impact of changed diet composition and its supplementation with B-group vitamins on selected parameters of calcium metabolism. Model tests

Summary

The basis for conducting experiment were the results of the author's own tests, which established the impact of supplementation with B-group vitamins that could change calcium management in the organism, in the case of animals which underwent the supplementation, consisting in:

– smaller consumption of feed, including calcium and magnesium;

– smaller, inadequate to the caloric value of the consumed feed, weight gains;

– increased accumulation of periorgan fat tissue, which secrete factors that intensify bone resorption.

A hypothesis was thus formulated that diet supplementation with B-group vitamins, through its impact on specific metabolic pathways and blood parameters, can significantly influence management of calcium and magnesium, which is in the dynamic balance with it in the organism, leading, among other things, to decreased amount of calcium and magnesium in bones, therefore, predisposing to development of osteoporosis.

The goal of the paper was to specify the impact of the changed diet composition, in which some of the whole wheat and maize grains were replaced with wheat flour and sucrose, and its supplementation with B-group vitamins on the selected parameters of calcium and magnesium management.

The tests were conducted on 42 six- to eight-month old male rats, divided into three groups. Those from the 1st group were fed with basic feed, those from the 2nd and 3rd groups – modified feed, in which some of the whole grains were replaced with wheat flour and sucrose. The 1st and 2nd group received water to drink, while the 3rd group – B-group vitamin water solution in the amount that several times exceeded animals' demand for individual vitamins. After the seven-week experiment, blood and selected tissue samples were taken from animals to determine indicators of calcium--magnesium management.

The analysis of the results confirms that modification of diet composition led to changed calcium amount in tissues, increasing its amount in the thigh bone, and decreasing it in the liver. Supplementation of modified diet with selected B-group vitamins caused that the tested animals increased urinary calcium excretion, what forced adaptive changes in the organism consisting in increased concentration of 1,25-dihydroxycholecalciferol responsible for calcium absorption. The applied supplementation also contributed to growth of calcium concentration in erythrocytes. It could be the result of bigger concentration of the active form of vitamin D_3 in this group of animals and of cell membrane destabilization, which increased its permeability. The body response to increased calcium concentration in erythrocytes could also be the observed increased concentration of magnesium in them, which prevents excessive accumulation of calcium in a cell. The observed increased accumulation of mesenteric fat in animals fed with supplemented diet, which intensifies free radical reactions, and bigger synthesis of endogenous vitamin D_3, can facilitate further accumulation of fat

tissue as a result of increased intracellular concentration of calcium, which stimulates lipogenesis and inhibits lipolysis. The scope of observed changes in magnesium management stimulated by modification of diet composition and its supplementation was definitely smaller in comparison with the changes in calcium management.

Bewertung des Einflusses der Änderung der Zusammensetzung der Diät und deren Suplementierung mit Vitaminen aus der B-Vitamin-Gruppe auf gewählte Parameter des Kalziumstoffwechsels. Modelluntersuchungen

Zusammenfassung

Die Grundlage für die Aufnahme des Experimentes stellten die Ergebnisse von früheren Eigenuntersuchungen dar, in welchen der Einfluss der Supplementierung mit Vitaminen aus der B-Vitamingruppe festgestellt wurde, die den Kalziumhaushalt im Organismus ändern kann und sich bei Tieren, deren Nahrung supplementiert wurde, wie folgt äußert:

– geringerer Verzehr von Futter, darunter von Kalzium und Magnesium;

– geringere Körpermassezunahme, die dem energetischen Wert des aufgenommenen Futters nicht entspricht;

– Zunahme der Akkumulation des viszeralen Fettgewebes, das Faktoren sekretiert, die eine verstärkende Wirkung auf die Knochenresorption haben.

Aus diesem Grund wurde eine Hypothese aufgestellt, dass die Supplementierung der Diät mit Vitaminen aus der B-Vitamin-Gruppe durch die Einwirkung auf bestimmte Stoffwechselwege und Blutparameter einen wesentlichen Einfluss auf den Haushalt mit Kalzium und mit Magnesium haben kann, die miteinander im Organismus in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, und u. a. zur Reduzierung der Kalzium- und Magnesiummenge in Knochen führen und damit die Entwicklung der Osteoporose prädisponieren kann.

Das Ziel der Arbeit war die Bestimmung des Einflusses der Änderung der Zusammensetzung der Diät, in welcher ein Teil von Vollkornweizen und Vollkornmais durch Weizenmehl und Saccharose ersetzt wurde, als auch deren Supplementierung mit Vitaminen aus der B-Vitamingruppe auf gewählte Parameter des Kalzium- und Magnesiumhaushalts.

Die Untersuchungen wurden auf 42 Rattenmännchen im Alter von sechs bis acht Monaten durchgeführt. Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt. Die Tiere aus der Gruppe I wurden mit dem Grundfutter gefüttert, dagegen die Tiere aus der Gruppe II und III mit modifiziertem Futter, wo ein Teil von Getreidevollkorn gegen Weizenmehl und Saccharose ersetzt wurde. Die Gruppe I und II erhielt zum Trinken Wasser und die Gruppe III eine Wasserlösung von Vitaminen aus der B-Vitamingruppe in Mengen, die den Bedarf der Tiere an einzelnen Vitaminen um das Mehrfache überschritten. Der Versuch dauerte sieben Wochen und nach seinem Ende wurde den Tieren das Blut und gewählte Gewebe zur Bestimmung der Indexe des Kalzium- und Magnesiumhaushalts entnommen.

Im Ergebnis der Auswertung von erhaltenen Ergebnissen wurde festgestellt, dass die Modifizierung der Diätzusammensetzung zur Änderung des Kalziumgehalts in Geweben führte, wobei dessen Gehalt im Schenkelknochen zunahm und in der Leber abnahm. Die Supplementierung der modifizierten Diät mit gewählten Vitaminen aus der B-Vitamingruppe verursachte bei untersuchten Tieren die Zunahme der Ausscheidung des Kalziums mit Harn, welches die Adaptationsänderungen

im Organismus erzwang, die auf der Zunahme der Konzentration von 1α,25-Dihydroxycholecalciferol beruhten, das für die Kalziumresorption verantwortlich ist. Die eingesetzte Supplementierung trug auch zur Zunahme der Kalziumkonzentration in Erythrozyten bei. Diese Zunahme konnte in dieser Tiergruppe aus der höheren Konzentration der aktiven Form von Vitamin D_3 und der Destabilisierung der Zellhaut resultieren, die deren Durchlässigkeit erhöhte. Die Antwort des Organismus auf die Zunahme der Kalziumkonzentration in Erythrozyten konnte die in ihnen gleichzeitig beobachtete Zunahme der Magnesiumkonzentration sein, die dem übermäßigen Ansammeln des Kalziums in der Zelle entgegenwirkt. Die bei den mit supplementierter Diät gefütterten Tieren beobachtete erhöhte Ansammlung von Gekrösefett, die die Freie-Radikale-Reaktionen verstärkt, als auch größere Synthese des endogenen D_3-Vitamins können weitere Ansammlung des Fettgewebes im Ergebnis der Zunahme der intrazellulären Konzentration des Kalziums begünstigen, das die Lipogenese stimuliert und die Lipolyse hemmt. Der Umfang der beobachteten Änderungen im Magnesiumhaushalt, die unter dem Einfluss der Modifizierung der Diätzusammensetzung und deren Supplementierung stattfinden, war eindeutig geringer als die Änderungen im Kalziumhaushalt.