

Marek Bieńko

Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Załącznik nr 2 do wniosku
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat w języku polskim i angielskim

AUTOREFERAT

dr n. biol. Marek Bieńko

Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 2018

1. Imię i nazwisko.

Marek Bieńko

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

stopień naukowy: doktor nauk biologicznych, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, rok 2000, tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ glinu na procesy rozwoju, wzrostu i mineralizację układu kostno-szkieletowego u kurcząt brojlerów.

studia podyplomowe z zakresu ochrony środowiska, Wydział Inżynierii Budowlanej i Sanitarnej Politechnika Lubelska, rok 1995.

tytuł: magister biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, rok 1992.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

1. od 1.10.1992 – 31.03.1995 Katedra Entomologii, Wydział Ogrodniczy, Akademia Rolnicza w Lublinie, asystent
2. od 01.04.1995 do 31.05.2000 Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, asystent
3. od 01.06.2000 do chwili obecnej Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1. Jednotematyczny cykl publikacji:

Stan czynnościowy układu kostnego w aspekcie wpływu wybranych czynników farmakologicznych i żywieniowych stosowanych u szczurów w warunkach zdrowia oraz doświadczalnej osteopenii badany metodami densytometrycznymi, tomograficznymi i wytrzymałościowymi.

Publikacje:

- 4.1.1. Bieńko M, Radzki RP, Wolski D. The peripheral quantitative computed tomographic and densitometric analysis of skeletal tissue in male Wistar rats after chromium sulfate treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017, 24, 446-452 (IF=0,829, MNiSW=20)

Wkład w autorstwo: 90%; opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, redagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

- 4.1.2. Radzki RP, Bieńko M, Polak P, Szkucik K, Ziomek M, Ostapiuk M, Bieniaś J. Is the consumption of snail meat actually healthy? An analysis of the osteotropic influence of snail meat as a sole source of protein in growing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2018, 102, 2, e885-e891 (IF=1,244, MNiSW=30)

Wkład w autorstwo: 70%; opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, współredagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

- 4.1.3. Bieńko M, Radzki R.P, Wolski D, Dębiak P, Szkucik K, Ziomek M, Gondek M. Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: A densitometric, tomographic and morphometric study. *Medycyna Weterynaryjna*, 2018 DOI:10.21521/mw.6030 (IF=0,161, MNiSW=15)

Wkład w autorstwo: 80% opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, opracowanie metody badawczej, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, redagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

- 4.1.4. Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzki RP, Filip D, Polak P. Densitometric, tomographic and mechanical parameters of the female Wistar rat skeletal system after lactoferrin and colostrum treatment in the condition of gonadectomy-induced osteopenia. *Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72, 580-586. (IF=0,161, MNiSW=15)

Wkład w autorstwo: 80% opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, opracowanie metody badawczej, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, redagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

4.1.5. Radzki RP, Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 94, 947-954 (IF=1,822 MNSiW=20)

Wkład w autorstwo: 75%; opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, współredagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

4.1.6. Radzki RP, Bieńko M, Pierzynowski SG. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2012, 30, 651-659 (IF=2,219 MNiSW=25)

Wkład w autorstwo: 80%; współopracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie badań, analizy densytometryczne i statystyczne, interpretacja uzyskanych wyników, współredagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

Łączna punktacja 6 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi:

- według listy czasopism punktowanych MNiSW – 125 punktów
- sumaryczny Impact Factor według listy JCR – 6,436

Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstaniu poszczególnych prac znajdują się w załączeniu.

4.2. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Kości jako czynne metabolicznie struktury pełnią w organizmie szereg istotnych funkcji. Rozwój tkanki kostnej rozpoczyna się już w okresie neonatalnym, a jej czynność metaboliczna zachowana jest przez całe życie. W tym czasie tkanka kostna podlega ciągłej przebudowie (remodelowaniu), która dotyczy zarówno wielkości i kształtu kości, jak i wewnętrznego przestrzennego ułożenia beleczek kostnych, co ostatecznie wpływa na ich wytrzymałość mechaniczną. Zmiany zachodzące w układzie kostnym podczas całego życia osobniczego można podzielić na okres szybkiej budowy szkieletu, okres jego dojrzewania i osiągnięcia szczytowej masy kostnej oraz na okres zaniku. Największą dynamikę zmian w metabolizmie tkanki kostnej stwierdza się w okresie dojrzewania oraz na początku wieku dojrzałego.

Remodeling kostny jest najistotniejszym procesem w odbudowywaniu nowej tkanki kostnej. Proces ten rozpoczynają osteoklasty, rozpuszczając uszkodzone fragmenty tkanki

kostnej i wytwarzając tzw. zatoki resorpcyjne, które w następnej kolejności są wypełniane nową tkanką przez osteoblasty. Nowo wytworzona tkanka kostna podlega procesowi mineralizacji w 2 etapach, które różnią się od siebie m.in. szybkością przebiegu. Fizjologiczna równowaga pomiędzy procesami resorpcji i odbudowy tkanki kostnej powoduje, że masa kostna utrzymuje się na względnie stałym poziomie (1).

Ważnym zadaniem procesu przebudowy kości jest usuwanie materiału „zmęczonego” cyklicznymi obciążeniami, a przez to o zmniejszonej wytrzymałości. Gdy częstotliwość i wielkość obciążeń przekroczy zdolności odtwórcze tkanki kostnej (jej przebudowy) dochodzi do ostatecznego przerwania jej ciągłości najpierw pod postacią mikropęknięć a potem złamań. Powszechnie uważa się, że kość zbita pełni rolę przede wszystkim mechaniczną, kość gąbczasta oprócz mechanicznej również metaboliczną. Budowa taka, z fizycznego punktu widzenia, tj. zewnętrzna część „rurowa” wzmocniona wewnętrzną siecią beleczek kości gąbczastej zapewnia szkieletowi maksymalną wydolność podczas przenoszenia obciążeń i pozwala również na najwyższą oszczędność budulca tworzącego tkankę kostną.

Do czynników mających kluczowe znaczenie dla procesu remodelingu zaliczyć należy hormony takie jak: parathormon, kalcytonina, hormon wzrostu, hormony tarczycy oraz hormony płciowe - androgeny i estrogeny. Regulujący wpływ na metabolizm kostny wywierają również: aktywne metabolity witaminy D₃, interleukiny, transformujący czynnik wzrostu, insulinopodobne czynniki wzrostu I i II, leptyna, czynnik martwicy nowotworów oraz interferon.

Dieta, związki mineralne, czynniki środowiskowe są również istotnymi elementami wpływającymi na metabolizm kostny. Mogą one sprzyjać tworzeniu się kości i spowalnianiu jej resorpcji, ale mogą również oddziaływać niekorzystnie przyspieszając resorpcję kości i zwalniając jej tworzenie.

Badania prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych, zwłaszcza na szczurach, które stały się modelowym gatunkiem doświadczalnym, pozwalają na dokładną analizę zmian zachodzących podczas zaburzenia procesów kostnienia. Gonadektomizowane szczury są powszechnie używane do określania stopnia zmian zachodzących w materiale kostnym wywoływanych brakiem hormonów płciowych. Taki rodzaj eksperymentu jest powszechnie stosowany jako najbardziej zbliżony zwierzęcy model badania procesów utraty tkanki kostnej u kobiet po menopauzie i związanej z tym osteoporozą. Przez długi okres uważano, że osteoporoza jest chorobą dotyczącą wyłącznie kobiet. Na fakt, że jest także schorzeniem

spotykanym również u mężczyzn zwrócono dopiero uwagę po analizie danych epidemiologicznych przeprowadzonych na blisko 10 000 osób w wieku ponad 50 lat, u których złamania kostne kręgosłupa obserwowano u ponad 27% kobiet i 26% mężczyzn. Mimo, że pewną liczbę złamań u mężczyzn określa się jako pourazowe, to większość obserwowana zwłaszcza w starszym wieku, reprezentuje złamania związane z nadmierną kruchością tkanki kostnej, podobnie jak u kobiet. Znamienne jest także to, że osteoporoza u mężczyzn jest rzadko rozpoznawana nawet po udokumentowanym złamaniu, w znacznym stopniu przypisywanym urazowi związanemu z pracą fizyczną (2,3). Ponieważ problem zmian kostnych dotyczy zarówno kobiet, jak i mężczyzn istnieje konieczność prowadzenia badań nad sposobami leczenia zmian kostnych również po andropauzie. Wykorzystanie modelu orchidektomizowanego szczura stwarza więc doskonałe warunki do oceny skuteczności działania różnych preparatów jako sposobu zapobiegania jak i leczenia tego typu schorzeń.

Obecnie najczęściej używanymi lekami z wyboru, stosowanymi w leczeniu osteoporozy u kobiet po menopauzie i mężczyzn po andropauzie, są bisfosfoniany. Są one syntetycznymi analogami pirofosforanu, który jest endogennym fizjologicznym inhibitorem mineralizacji i mają zdolność hamowania procesów resorpcji. Bisfosfoniany silnie wiążą się z kryształkami hydroksyapatytu i mogą pozostawać w kościach przez wiele lat. Gromadzą się one wybiórczo nie tylko w miejscach mineralizacji tkanki kostnej, ale również na powierzchniach ulegających resorpcji. Podczas procesu resorpcji bisfosfoniany są uwalniane z kości i częściowo wychwytywane przez osteoklasty, powodując upośledzenie ich zdolności do resorbowania tkanki kostnej. Terapia z zastosowaniem bisfosfonianów jest najczęściej stosowaną metodą leczenia chorób układu kostnego, które charakteryzują się nadmierną lub niezbalansowaną przebudową kostną, podczas której aktywność osteoklastów i osteoblastów nie jest ściśle sprzężona, prowadząc do nadmiernej resorpcji tkanki kostnej przez osteoklasty. Bisfosfoniany są stosowane w przypadkach osteoporozy pomenopauzalnej (4), osteoporozy indukowanej glikokortykoidami (5) oraz osteoporozy wieku dziecięcego (6,7). Stosuje się je także w przypadku występowania przerzutów nowotworowych do kości, choroby Paget'a czy szpiczaka mnogiego (7,8). Niestety oprócz niewątpliwie pożądaných efektów bisfosfoniany wykazują także działania ujemne. Najczęstsze działanie niepożądane bisfosfonianów to drażniący wpływ na przewód pokarmowy - głównie na przełyk oraz błonę śluzową żołądka. W przypadku stosowania dożylnego efektem ubocznym może być podwyższenie temperatury ciała, reakcje zapalne czy też niewydolność nerek (9,10). Do najgroźniejszych powikłań zalicza

się martwicę kości szczęki występującą samoistnie po terapii bisfosfonianami (ang. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw – BRONJ), lub też rozwijającą się u pacjentów przyjmujących te preparaty po ekstrakcji zębów i innych zabiegach chirurgicznych (11). Kolejnym negatywnym efektem przyjmowania bisfosfonianów może być ich wpływ na wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej ze względu na sugestię, że ich stosowanie zwiększa ryzyko wystąpienia w kościach mikropęknięć. Ma i wsp. (12) opublikowali wyniki badań osób w wieku 60-90 lat, z których wynika, iż w kościach osób zażywających bisfosfoniany występowało o 24% więcej mikropęknięć niż w kościach osób chorych, którzy ich nie przyjmowali i o 54% więcej niż w zdrowo starzejących się kościach. Należy także pamiętać, że leki przeciwosteoporotyczne tylko wzmacniają kości nie odbudowując ich jednakże w 100%. Stąd też konieczność poszukiwania alternatywnych metod leczenia chorób układu kostnego.

Definicja osteoporozy według WHO mówi, że jest to „choroba układowa szkieletu, charakteryzująca się niską masą kości, zaburzoną mikroarchitekturą tkanki kostnej powodującą zwiększoną podatność na złamania”. Jednak ostatnie badania epidemiologiczne (13) wykazały, że większość złamań niskoenergetycznych tzn. osteoporotycznych występuje u osób z prawidłową lub tylko nieznacznie obniżoną, osteopeniczną, masą kostną. Dlatego też Narodowy Instytut Zdrowia (NIH) i Narodowa Fundacja Osteoporozy (NOF) (14) zdefiniowały osteoporozę jako „chorobę wynikającą ze zmniejszonej wytrzymałości kości, predysponującą do złamań”. W związku z tym, bardzo zasadne jest uzyskiwanie informacji o wpływie stosowanych preparatów na wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej i jej odporność na mikrouszkodzenia wynikające z obciążeń statycznych i dynamicznych.

Naturalnie powtarzające się cykliczne obciążenia szkieletu wynikające z normalnej aktywności ruchowej organizmów żywych, a przede wszystkim ze zdolności do przemieszczania się, powodują wielokrotne odkształcenia kości w zakresie sprężystym. W pewnym zakresie odkształcenie kości w stosunku do działającej siły pozostaje proporcjonalne, co jest zgodne z prawem Hook'a (ciała sprężyste odkształcają się proporcjonalnie do przyłożonej siły, a po jej ustąpieniu odzyskują poprzedni kształt). Z punktu widzenia mechaniki przyjmujemy, że kości poddawane są trzem podstawowym rodzajom odkształceń tj. rozciąganiu, ściskaniu i ścinaniu (skręcaniu). Siła rozciągająca powoduje wydłużenie, siła ściskająca zmniejszenie wymiaru, a ścinająca przedstawia tendencję do przemieszczania się jednej części kości względem drugiej. Wszystkie te rodzaje sił mogą działać samodzielnie lub w różnych kombinacjach.

Badania wytrzymałościowe kości mogą być prowadzone na odpowiednio przygotowanych próbkach o określonym rozmiarze i kształcie lub całych kościach. W roku 1971 Burstein i Frankel (15) przedstawili kryteria jakie powinien spełniać test dla prób wytrzymałościowych izolowanych kości. W badaniach doświadczalnych szeroko wykorzystuje się metody polegające na obciążeniach dynamicznych w tzw. trój- lub czteropunktowym teście ugięcia, wykonywane z użyciem specjalnej głowicy przesuwanej się ze stałą prędkością i rejestrującej zmiany zachodzące w badanej próbce. Analiza wytrzymałości opiera się na ocenie szeregu parametrów np. siły maksymalnej, przy przekroczeniu której dochodzi do złamania kości, granicy sprężystości (przy której nie występują jeszcze zmiany nieodwracalne) będącej określeniem zmian elastycznych w tkance kostnej, modułu Younga, pracy potrzebnej do złamania. Badania wytrzymałościowe kości długich są prowadzone w dwojaki sposób; albo na specjalnie wyciętych fragmentach trzonu kości lub na całych kościach przy czym ten ostatni sposób jest bardziej zbliżony do symulacji rzeczywistych sił działających na kość. Często popełnianym błędem przy analizach całych kości jest rozpatrywanie ich jako model „pręta” zamiast modelu „rury” jaką faktycznie jest kość długa, ze względu na niemożność określenia faktycznych średnic wewnętrznych trzonu kości w punkcie działania głowicy maszyny wytrzymałościowej. W badaniach własnych przy zastosowaniu analizy pQCT określono rzeczywiste przekroje geometryczne badanych kości co umożliwiło zastosowanie metody trójpunktowego testu ugięcia (opartego o model „rury”), który pozwala na określenie faktycznej wytrzymałości tkanki kostnej na działanie sił odkształcających co również wiązało się z autorską modyfikacją programu do analizy wytrzymałości. W przypadku kości żuchwy zastosowano model próbki płaskiej.

Konwencjonalne zdjęcia rentgenowskie nie są przydatne do oceny gęstości kości. Odwapnienie kości staje się na nich wyraźne dopiero po zmniejszeniu gęstości kości o 40% (16). Ponadto zdjęcie Rtg nie pozwala na ilościową ocenę gęstości. Przełomem w diagnostyce układu kostnego było wprowadzenie metod densytometrycznych umożliwiających ilościową ocenę gęstości minerału kostnego, a zwłaszcza metody opartej na dwuwiązkowej absorpcjometrii rentgenowskiej (ang. Dual X-ray Absorptiometry - DXA), która stała się „złotym standardem” w pomiarach gęstości kośćca i jest bardzo pomocna w wykrywaniu takich chorób jak osteoporoza. W badaniach na ludziach stosuje się ściśle określone zalecenia dotyczące miejsca pomiaru tj. nasady bliższej kości udowej, nasady dalszej kości przedramienia oraz kręgów odcinka lędźwiowego. Uzyskany z tych miejsc pomiarowych wynik

porównywany jest z wartością średniej szczytowej gęstości mineralnej kości oraz ze średnią wartością BMD (ang. Bone Mineral Density) uwzględniającą płeć, wiek i masę ciała badanego pacjenta. Wynik takiego porównania z wartościami „należnymi” prezentowany jest w procentach (% young adult) lub jako liczbę odchyłeń standardowych od średniej szczytowej masy kostnej (T-score) i liczbę odchyłeń standardowych od wartości należnej dla danej płci, wieku i masy ciała pacjenta (Z-score). W badaniach na zwierzętach procedura taka jest niestety nieprzydatna ze względu na brak baz referencyjnych do których można by porównać otrzymany podczas badania wynik. Na potrzeby badań naukowych (zwłaszcza zwierząt laboratoryjnych) opracowano specjalny program pozwalający na pomiar całego kośćca (Total Body Scan) lub pojedynczych, wypreparowanych kości (Small Subject Scan lub Research Scan). Pomiar Total Body Scan pozwala także na pomiar zawartości tkanki łącznej (Lean Mass) i tkanki tłuszczowej (Fat Mass). Wyniki uzyskane w badaniu densytometrycznym wyrażone są jako dwuwymiarowy rzut na płaszczyznę i przeliczane bądź na jej powierzchnię jako Bone Mineral Content - BMC (wyrażoną w g/cm), bądź na cm² płaszczyzny pomiarowej Bone Mineral Density - BMD (wyrażoną w g/cm²).

Tomografia komputerowa, a zwłaszcza jej odmiana pQCT (ang. Peripheral Quantitative Computed Tomography, obwodowa ilościowa tomografia komputerowa) jest obecnie jedną z najnowocześniejszych technik umożliwiających nieinwazyjne pomiary gęstości kości nie tylko w materiale izolowanym ale również przyżyciowo. Metoda pQCT pozwala na pomiar rzeczywistej gęstości tkanki kostnej różnicując ją przy tym na tkankę kostną zbitą i gąbczastą (beleczkową). Badanie tomograficzne pQCT rejestruje także dane dotyczące geometrii przekroju, obrysy obydwu struktur kostnych – zbitej i gąbczastej – oraz inne informacje służące do obliczenia charakterystyki wytrzymałościowej przekroju kości. Metoda ta opiera się na stwierdzeniu, że o wytrzymałości kości decyduje struktura korowa, jej rozmieszczenie na obwodzie przekroju oraz grubość. Przewidywanie wytrzymałości mechanicznej tkanki kostnej polega na wyznaczeniu na podstawie pomiarów momentów bezwładności (CSMI), które określają geometryczny kształt przekroju względem osi głównych, przechodzących przez środek geometryczny i względem niego. Drugim etapem jest obliczenie właściwych wskaźników wytrzymałości (SSI – Strength Strain Index, BSI – Bone Strength Index) według tych samych punktów odniesienia (17). Ze względu na fakt, że metoda DXA również umożliwia badanie przyżyciowe obie te metody doskonale się uzupełniają stanowiąc podstawę do

kompleksowej oceny tkanki kostnej i składu ciała w warunkach długotrwałego doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych.

Połączenie nowoczesnych metod badania gęstości mineralnej tkanki kostnej, jakości strukturalnej, wytrzymałości mechanicznej na działanie sił obciążających i metod biochemicznej oceny metabolizmu stanowi podstawę do kompleksowej diagnostyki układu kostnego w warunkach zdrowia, wpływu czynników środowiskowych, żywieniowych, farmakologicznych i hormonalnych oraz w przypadku schorzeń metabolicznych o różnym podłożu, co pozwala nie tylko na ukierunkowaną ocenę występujących zagrożeń, ale także na wdrożenie postępowania terapeutycznego.

Wyniki dotyczące omówionej problematyki zostały przedstawione w pracach stanowiących cykl publikacji jako tzw. osiągnięcie naukowe pt. **„Stan czynnościowy układu kostnego w aspekcie wpływu wybranych czynników farmakologicznych i żywieniowych stosowanych u szczurów w warunkach zdrowia oraz doświadczalnej osteopenii badany metodami densytometrycznymi, tomograficznymi i wytrzymałościowymi”**.

Chrom jest pierwiastkiem dostępnym w różnych formach. Najczęstszymi są formy trój- i sześciowartościowe. Formy sześciowartościowe mają zastosowanie przemysłowe między innymi w garbarniach, do produkcji pigmentów farb drukarskich itp. Ze względu na szeroki wachlarz działań niepożądanych oraz znaczny stopień toksyczności powodują duże zagrożenie środowiskowe dla ludzi i zwierząt. Formy trójwartościowe najczęściej spotykamy w żywności np. drożdżach, produktach zbożowych, suchych nasionach roślin strączkowych, mięsie, serach, jajach. Jedną z największych zawartości chromu cechuje się kakao (176 µg/100 g produktu). Związki chromu trójwartościowego stosowane są także jako dodatki do żywności i suplementy. Chrom jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania receptorów insulinowych, wchodzi bowiem w skład (współ z kwasem nikotynowym, glicyną, cysteiną i kwasem glutaminowym) tzw. czynnika tolerancji glukozy (ang. Glucose Tolerance Factor - GFT) (18) aczkolwiek w ostatnich latach istnienie samego GFT zaczyna budzić wątpliwości (19). W chwili obecnej rola chromu staje się coraz bardziej kontrowersyjna. W roku 2014 EFSA (ang. European Food Safety Authority) wyraźnie stwierdziła, że chrom nie jest już traktowany jako niezbędny dla zdrowia ludzi i zwierząt pierwiastek śladowy, a jego działanie należy bardziej rozpatrywać jako efekt farmakologiczny. Jednocześnie na rynku istnieje ogromna liczba różnorodnych suplementów diety, odżywek sportowych i dietetycznych zawierających w swym składzie chrom trójwartościowy. W porównaniu z tkankami miękkimi, kości

charakteryzują się szczególną zdolnością do wbudowywania w swoją macierz niektórych metali, w tym chromu, które później mogą wywierać wpływ na metabolizm kostny (20). W związku z tym układ kostny może pełnić rolę naturalnego bioindykatora zanieczyszczeń środowiska. O ile negatywny wpływ chromu sześciowartościowego na metabolizm kostny jest dobrze znany to brakuje informacji dotyczących długotrwałego wpływu formy trójwartościowej (21-24). Dlatego też praca „**The peripheral quantitative computed tomographic and densitometric analysis of skeletal tissue in male Wistar rats after chromium sulfate treatment**” (Bieńko M., Radzki R.P., Wolski D. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2017, 24, 3, 446–452), miała na celu określenie skutków długotrwałego podawania różnych dawek chromu trójwartościowego na układu kostny szczurów badany metodami tomograficznymi, densytometrycznymi i wytrzymałościowymi. Badania przeprowadzono na 40 zdrowych samcach szczurów rasy Wistar, pochodzących z hodowli Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w wieku około 2,5 miesiąca i początkowej masie ciała około 200 ± 10 g. Po 7-dniowej aklimatyzacji, zwierzęta podzielono losowo na 4 grupy (1 grupa kontrolna i 3 grupy doświadczalne). Zwierzętom grup doświadczalnych podawano codziennie, dożołądkowo za pomocą specjalnej sondy (Instech Lab. USA) dobranej do wieku i masy ciała zwierzęcia, siarczan chromu, rozpuszczony w płynie fizjologicznym, w 3 dawkach tj. $400 \mu\text{g}/\text{kg mc}$ (grupa CR1), $600 \mu\text{g}/\text{kg mc}$ (grupa CR2) i $800 \mu\text{g}/\text{kg mc}$ (ekwiwalent 104, 156 i $208 \mu\text{g}/\text{Cr}/\text{kg mc}$). Grupa kontrolna (CON) otrzymywała odpowiednią objętość płynu fizjologicznego. Masę ciała zwierząt kontrolowano 2 razy w tygodniu i na tej podstawie dobierano dawki. Po 90-dniowym okresie podawania chromu zwierzęta uśmiercono, zważono i poddano badaniu densytometrycznemu (DXA) w celu ustalenia gęstości mineralnej (tBMD) oraz zawartości mineralnej (tBMC) całego kośćca, kręgów lędźwiowych (L2-L4) oraz zawartości tkanki mięśniowej (Lean Mass) i tkanki tłuszczowej (Fat Mass). Następnie wypreparowano kości udowe, które po oczyszczeniu z tkanek miękkich poddano dalszym badaniom densytometrycznym, tomograficznym i wytrzymałościowym. Przy pomocy metody obwodowej ilościowej tomografii komputerowej (pQCT) zbadano właściwości zarówno tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej. W 50% długości kości określono parametry całkowitego przekroju poprzecznego kości udowych oraz tkanki kostnej zbitej analizując całkowitą zawartość mineralną kości (Tot.BMC), całkowitą wolumetryczną gęstość mineralną kości (Tot.vBMD), całkowitą powierzchnię kości (Tot.Ar), zawartość mineralną tkanki kostnej zbitej (Ct.BMC), wolumetryczną gęstość mineralną tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD), powierzchnię

tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar), grubość tkanki kostnej zbitej (Ct.Th), obwód zewnętrzny kości (Peri.C), obwód wewnętrzny kości (Endo.C) oraz osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI). Wykonano również pomiary całkowitego przekroju poprzecznego kości udowych oraz tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej analizując całkowitą powierzchnię kości (Tot.Ar), powierzchnię tkanki kostnej gąbczastej (Tb.Ar), całkowitą wolumetryczną gęstość mineralną kości (Tot.vBMD), całkowitą zawartość mineralną kości (Tot.BMC), wolumetryczną gęstość mineralną tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMD) oraz zawartość mineralną tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC). Po wykonaniu badań densytometrycznych i tomograficznych wyizolowane kości udowe poddano badaniu wytrzymałościowemu w tzw. trójpunktowym teście ugięcia określając siłę maksymalną i moduł Young'a.

Uzyskane wyniki wskazują, iż długotrwałe stosowanie siarczanu chromu wywarło negatywny wpływ na niektóre parametry charakteryzujące układ kostny. Analiza densytometryczna całości szkieletu wykazała statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek zarówno tBMD jak i tBMC we wszystkich grupach doświadczalnych. Taką samą tendencję obserwowano w przypadku analizy całościowej izolowanych kości udowych oraz kręgów lędźwiowych odcinka L2-L4. Szczegółowa analiza tomograficzna izolowanych kości udowych wykazała, że bardziej wrażliwa na długotrwałe podawanie chromu była część przynasadowa. Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej była niższa we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu z kontrolą odpowiednio o 16,2%, 18% i 22,9%. Również zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej wykazała statystycznie niższe wartości we wszystkich grupach otrzymujących siarczany chromu (13,7%, 16,5%, 21,8% vs. CON). Podobną tendencję obserwowano także w odniesieniu do całkowitej wolumetrycznej gęstości kości (Tot.vBMD), całkowitej zawartości mineralnej kości (Tot.BMC), a także całkowitej powierzchni kości (Tot.Ar). Analiza trzonu kości udowych wykazała statystycznie istotny spadek całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej (Tot.vBMD) w grupie CR3, która otrzymywała największą dawkę chromu w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany w strukturze tkanki kostnej znalazły również swoje odzwierciedlenie w badaniach wytrzymałościowych. Kości udowe poddane trójpunktowemu testowi ugięcia wykazały statystycznie istotne ($p < 0,05$) zmniejszenie siły maksymalnej a co za tym idzie wytrzymałości kości na złamanie po zastosowaniu wszystkich trzech dawek siarczanu chromu. Siła maksymalna w grupie CR1, CR2 i CR3 wynosiła odpowiednio: 217,4N, 161,02N i 148,14 N podczas gdy w grupie kontrolnej 239,2 N. Taka sama statystycznie istotna tendencja miała miejsce w odniesieniu do modułu

Young`a. Statystycznie istotne ($p < 0,05$) były również zmiany dotyczące masy ciała oraz zawartości tkanki mięśniowej (Lean Mass). Podawany przez 90 dni chrom spowodował zmniejszenie obu analizowanych parametrów w grupach doświadczalnych. Odnotowano także zmniejszenie zawartości tkanki tłuszczowej (Fat Mass) jednakże zmiany te nie miały cech istotności.

Potencjalny mechanizm oddziaływania chromu na tkankę kostną został przedstawiony już w roku 1995 (25). Wyniki opublikowane w omawianej pracy są zgodne z wcześniejszymi pracami między innymi De Lucca i wsp. (26) i Soudani i wsp. (27), które dotyczą negatywnego wpływu chromu sześciowartościowego na układ kostny, przejawiającego się zaburzeniami metabolizmu kostnego i formowania nowej tkanki nie tylko kości długich, ale także żuchw. Również obserwacje dotyczące większej wrażliwości tkanki kostnej gąbczastej w porównaniu z kością zbitą na oddziaływania różnych czynników są zgodne z innymi doniesieniami (28,29).

W ostatnich latach chrom w postaci suplementu diety jest często polecany jako środek wspomagający odchudzanie, przyrost tkanki mięśniowej i redukcję tkanki tłuszczowej. Jednakże wyniki badań nad wpływem suplementacji chromem na masę i skład ciała również nie są jednoznaczne, a wiele z nich nie wykazało istotnego wpływu tej suplementacji na redukcję masy ciała. W omawianej pracy widoczny był efekt zmniejszenia się zawartości tkanki tłuszczowej, jednakże - co może być niepokojące - odnotowano także spadek zawartości tkanki mięśniowej. Również otrzymane wyniki dotyczące negatywnego wpływu chromu na układ kostny sugerują konieczność zwrócenia bacznej uwagi na formę trójwartościową i przeprowadzenia dalszych badań tej formy chromu pod kątem wpływu na kości. Zasadnym wydaje się więc, w przypadku stosowania suplementacji chromem, zachowanie ostrożności z uwagi na możliwość wystąpienia szkodliwego działania tego pierwiastka przy nadmiernym jego spożyciu.

Oprócz czynników środowiskowych mających wpływ na metabolizm tkanki kostnej istnieje również szereg czynników pochodzenia żywieniowego, które mogą modyfikować stan układu kostnego. Należy pamiętać, że prawidłowo zbilansowana dieta oraz aktywność fizyczna zmniejszają ryzyko rozwoju metabolicznych schorzeń układu kostnego. Jest to szczególnie ważne w okresie wzrostu i rozwoju organizmu, kiedy dochodzi do budowania szkieletu a później jego dojrzewania. Dlatego też wszystkie czynniki, które negatywnie wpływają w tym okresie na układ kostny mogą mieć istotne następstwa w wieku późniejszym i okresie starości. Złe nawyki żywieniowe, niedostateczne spożycie wapnia, niedobór lub nadmierne spożycie

białka, fosforu, sodu oraz niechęć do ćwiczeń fizycznych to jedne z najczęściej wymienianych przyczyn, oprócz czynników hormonalnych i genetycznych, nadmiernej utraty masy kostnej i osteoporozy. Wiadomo, że białko zawarte w pożywieniu wpływa na jakość materiału kostnego poprzez udział w syntezie kolagenu i innych białek macierzy kostnej co wskazuje także na związek między spożyciem białka a gęstością mineralną kości (BMD) (30,31). Zalecane wartości spożycia białka dla człowieka wynoszą 0,9 – 1,0 g/kg mc. Przyjmowanie mniejszych ilości może mieć negatywny wpływ na mineralizację układu kostnego poprzez zmniejszenie wchłaniania wapnia i wtóre zwiększenie stężenia parathormonu. Davine i wsp. (32) stwierdzili znacznie obniżoną gęstość mineralną kości udowych u starszych kobiet spożywających zbyt małą ilość białka. Jednocześnie należy pamiętać, że nadmierne spożycie białka, zwłaszcza zwierzęcego, jest jednym z czynników zwiększających ryzyko wystąpienia osteoporozy (31). Przeprowadzone badania kliniczne wykazują, że wraz ze wzrostem spożycia białka pochodzenia zwierzęcego dochodzi do wzrostu wydalania wapnia z moczem, co jednocześnie może prowadzić do wystąpienia ujemnego bilansu wapnia, przyspieszenia obrotu kostnego i rozwoju osteoporozy. Przy dziennym wzroście spożycia białka o 50 g wzrasta także wydalanie wapnia z moczem (średnio o 50-60 mg), a jak stwierdzili Kerstetter i wsp. (33) wydalanie wapnia koreluje dodatnio ze spożyciem białka zwierzęcego a ujemnie ze spożyciem białka roślinnego. Przyjmuje się także, że osoby stosujące dietę wegetariańską są mniej podatne na schorzenia metaboliczne układu kostnego w przeciwieństwie do osób stosujących dietę mieszaną, mimo podobnego poziomu spożycia wapnia (34). Różnice te wynikają ze specyficznych właściwości metioniny i cysteiny należących do aminokwasów siarkowych, których duże ilości występują w białkach zwierzęcych. Siarczyny, które powstają podczas przemian metabolicznych tych aminokwasów zwiększają kwaśność moczu, co jest czynnikiem zwiększającym filtrację kłębuszkową i jednocześnie ogranicza reabsorpcję wapnia w kanalikach nerkowych, a jednocześnie może pobudzać resorpcję tkanki kostnej poprzez uwalnianie z niej zasadowych soli wapniowych i magnezowych o działaniu buforującym (33, 35-37).

W ostatnich latach obserwuje się pojawianie na rynku nowych rodzajów żywności. Jednym z nich są ślimaki, których spożycie w Polsce systematycznie wzrasta przy światowej konsumpcji wynoszącej około 30 tysięcy ton. Najbardziej popularnymi gatunkami są: ślimak duży szary (*Cornu aspersum maxima*), ślimak mały szary (*Cornu aspersum aspersum*) i ślimak winniczek (*Helix pomatia*), które pozyskiwane są ze specjalistycznych hodowli oraz wolnego

odłowy. Mięso ślimaków charakteryzuje się stosunkowo wysoką zawartością białka (15–16%), przy stosunkowo niskiej zawartości tłuszczu (od 1,2 do 2,4%). Największą część w mięsie ślimaków stanowi za to woda, której jest około 80%. Mięso ślimaków jest pełnowartościowe pod względem zawartości aminokwasów egzogennych. Ich zawartość w mięsie winniczków wynosi 45%, natomiast rodzaj *Cornu* zawiera średnio 35,5% ogólnej ilości aminokwasów. Mięso ślimaków charakteryzuje się również wysoką zawartością witaminy A i witamin z grupy B oraz dużą zawartością sodu, potasu i żelaza.

W dwóch kolejnych pracach pt: „**Is the consumption of snail meat actually healthy? An analysis of the osteotropic influence of snail meat as a sole source of protein in growing rats (Radzki RP, Bieńko M, Polak P, Szkucik K, Ziomek M, Ostapiuk M, Bieniaś J. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102, 2, e885-e891)** oraz „**Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: A densitometric, tomographic and morphometric study**” (Bieńko M, Radzki R.P, Wolski D, Dębiak P, Szkucik K, Ziomek M, Gondek M. *Medycyna Weterynaryjna*, 2018 DOI:10.21521/mw.6030) podjęto ocenę wpływu diety zawierającej białko pochodzące z mięsa trzech różnych gatunków ślimaków na stan układu kostnego.

Badania przeprowadzono na 40 zdrowych samcach szczurów rasy Wistar o początkowej masie około 50 gramów. Po 7-dniowej aklimatyzacji zwierzęta podzielono losowo na 3 grupy eksperymentalne karmione paszą, w której źródłem białka było mięso ślimaków *Cornu aspersum maxima* (grupa CAM), *Cornu aspersum aspersum* (grupa CAA) i *Helix pomatia* (grupa HP) oraz grupę kontrolną (grupa CON) żywioną paszą z dodatkiem kazeiny jako źródła białka. Po 28-dniowym okresie żywienia zwierzęta uśmiercono i pobrano krew do oznaczeń biochemicznych: osteokalcyna (OC), C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I (CTX-I). Następnie wykonano badanie densytometryczne całego ciała oznaczając gęstość mineralną (tBMD) i zawartość mineralną (tBMC) całego kośćca, a także określono zawartość tkanki mięśniowej (Lean Mass) i tłuszczowej (Fat Mass). Wyizolowane kości piszczelowe poddano badaniu z zastosowaniem metody DXA, pQCT, 3D-microCT oraz badaniom wytrzymałościowym. Z uwagi na fakt, iż wiele prac naukowych (38–42) wykazuje korelację między gęstością mineralną (BMD) szyjki kości udowej oraz odcinka lędźwiowego kręgosłupa a stanem żuchwy u zwierząt doświadczalnych z wywołaną osteopenią oraz kobiet po menopauzie analizie poddano także izolowane żuchwy w celu zweryfikowania hipotezy, iż mogą one stanowić identyfikator zaburzeń metabolicznych związanych z nieprawidłowym odżywianiem. W tym celu wyizolowane

żuchwy poddano badaniom densytometrycznym, tomograficznym, morfometrycznym i wytrzymałościowym. Uzyskane wyniki są pierwszymi badaniami, wykazującymi osteotropowy wpływ diety, w której podstawowym źródłem białka jest mięso ślimaków, na jakość układu kostnego. Analiza densytometryczna całego szkieletu wykazała statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek zawartości mineralnej kości (BMC), co w przypadku całego szkieletu i kości piszczelowej było najbardziej widoczne w grupie CAA. W przypadku żuchwy najniższymi wartościami BMC, w stosunku do kontroli, charakteryzowała się grupa CAM. Zastosowanie diety zawierającej mięso ślimaków niekorzystnie wpłynęło także na gęstość mineralną. Najniższymi, w stosunku do kontroli, wartościami BMD całego szkieletu i żuchwy wykazała się grupa CAM, a w przypadku kości piszczelowej grupa HP. Kości piszczelowe poddano także analizie pQCT oraz 3D- μ CT. Uzyskane wyniki wskazują, że dodatek białka pochodzącego z mięsa ślimaków niekorzystnie wpłynął zarówno na część zbitą jak i gąbczastą badanych kości piszczelowych. Przejawiało się to między innymi w statystycznie istotnym spadku zawartości mineralnej tkanki kostnej zbitej (Ct.BMC) oraz wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD) mierzonych w 50% długości trzonu kości zwłaszcza w grupie CAA. Istotnemu obniżeniu uległa też powierzchnia tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar). Analiza dalszej części przynasadowej kości piszczelowych wykazała spadek zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC) zwłaszcza w grupie CAA i HP. Badanie z zastosowaniem techniki mikrotomografii (3D- μ CT) części gąbczastej również wykazało niekorzystny wpływ żywienia dietą zawierającą białko pochodzące z mięsa ślimaków. Statystycznie istotnemu obniżeniu uległa grubość beleczek kostnych (Tb.Th), szczególnie w grupie CAA i CAM, liczba beleczek (Tb.N) oraz zwiększyła się odległość między poszczególnymi beleczkami (Tb.Sp). Wpływ diety zawierającej mięso trzech różnych gatunków ślimaków, jako podstawowe źródło białka, analizowano również w kontekście jej wpływu na stan żuchw szczurów. Również w tym przypadku statystycznie istotnemu ($p < 0,05$) obniżeniu uległy parametry tomograficzne dotyczące zarówno tkanki kostnej zbitej jak i gąbczastej szczególnie wyraźnie widoczne w grupie CAM. Przeprowadzone badania wytrzymałościowe, metodą trójpunktowego testu ugięcia, wykazały spadek wytrzymałości żuchw na działanie obciążeń w zakresie siły maksymalnej w grupach otrzymujących dietę z zawartością białka pochodzącego od ślimaków w porównaniu z dietą opartą o kazeinę. Przeprowadzono również analizę morfometryczną żuchw na podstawie zdjęć rentgenowskich, która także wykazała zmniejszenie wielkości oraz pola powierzchni badanych próbek pochodzących z grup doświadczalnych w porównaniu z

grupą kontrolną. Uzyskane wyniki związane z żywieniem dietą opartą o białko z mięsa ślimaków są podobne do rezultatów otrzymanych w innych pracach dotyczących negatywnego wpływu braku hormonów płciowych na stan czynnościowy układu kostnego i wywołaną tym brakiem osteopenię przejawiającą się między innymi zmniejszeniem BMD i BMC a także większą podatnością na działanie sił obciążających. Sugeruje to konieczność zachowania szczególnej ostrożności w stosowaniu diety u ludzi i zwierząt opartej w dużej mierze o białko pochodzące od różnych gatunków ślimaków ze względu na możliwość wystąpienia negatywnych zmian, zwłaszcza, że w dostępnym piśmiennictwie brak jest prac, które opisywałyby jakikolwiek wpływ „diety ślimakowej” na układ kostny.

Na jakość układu kostnego oprócz czynników środowiskowych i żywieniowych mają również wpływ czynniki hormonalne, a jednym z najczęściej spotykanych schorzeń związanych z niedoborem hormonów płciowych jest osteoporoza cechująca się wzmożonym procesem resorpcji kości wskutek czego dochodzi do zmniejszenia masy i wytrzymałości kości, a następstwem takiego stanu jest zwiększone ryzyko złamań.

W pracy pod tytułem „**Densitometric, tomographic and mechanical parameters of the female Wistar rat skeletal system after lactoferrin and colostrum treatment in the condition of gonadectomy-induced osteopenia**” (Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzki R.P, Filip D, Polak P. **Medycyna Weterynaryjna, 2016, 72, 580-586**) oceniono możliwość zastosowania siary i laktoferyny jako potencjalnych czynników ograniczających negatywny wpływ owariektomii i związany z tym brak hormonów płciowych na stan jakościowy szkieletu w doświadczeniu opartym o model gonadektomizowanego szczura

Siara, a w okresie późniejszym również mleko, stanowią kompletny i bardzo wartościowy pokarm dla rozwijającego się organizmu. Siara jest wydzieliną gruczołu mlekowego samic ssaków, gromadzoną i produkowaną w końcowym okresie ciąży oraz w pierwszych dniach po porodzie. Dostarcza ona noworodkowi niezbędne substancje odżywcze oraz składniki biologicznie czynne, zapewniające odpowiedni poziom zabezpieczenia i stymulacji układu immunologicznego. Najważniejszą frakcją białkową w siarze są immunoglobuliny, zapewniające noworodkowi odporność przeciwko chorobotwórczej florze bakteryjnej, z którą ma kontakt po urodzeniu. Poza immunoglobulinami w skład siary wchodzi także inne białka, hormony, czynniki wzrostu (insulinowy czynnik wzrostu I i II, TGF alfa, beta1 i beta2, FGF, EGF, GM-CSF, PDGF, VEGF) enzymy i jelitowe peptydy regulacyjne oraz duża grupa czynników o działaniu antybakteryjnym, prebiotyki i probiotyki (43-46).

Laktoferyna jest białkiem występującym w mleku, a także w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych. Stymuluje proliferację i dojrzewanie osteoblastów, a także zmniejsza ich apoptozę o około 50-70%. Hamuje różnicowanie się komórek prekursorowych osteoklastów oraz aktywność osteoklastów dojrzałych, a tym samym przeciwdziała resorpcji kości (47-51). Wywiera także pośrednie działanie ochronne na układ kostny ze względu na zdolność hamowania osteolitycznie działających cytokin (IL-1 β oraz czynnika TNF- α), których stężenie wzrasta podczas stanów zapalnych.

W przeprowadzonych badaniach porównano skuteczność oddziaływania na tkankę kostną siary i laktoferyny podawanych oddzielnie w dwóch różnych dawkach przez okres 40 dni w warunkach ustalonej osteopenii wywołanej obustronną owariektomią.

Badania przeprowadzono na 36 samicach szczurów rasy Wistar w wieku 9-10 tygodni. Po aklimatyzacji zwierząt do warunków zwierzętarni podzielono je losowo na grupę kontrolną operowaną rzekomo (SHO) oraz 5 grup, u których wykonano operacje obustronnej owariektomii (OVX). Wszystkie zabiegi chirurgiczne wykonano w warunkach znieczulenia ogólnego. Po 60-dniowym okresie indukcji osteopenii grupy OVX losowo podzielono na grupę kontrolną otrzymującą płyn fizjologiczny (OVX-PHS) oraz 4 grupy doświadczalne otrzymujące: laktoferynę w dawce 20 i 40 mg/kg m.c (OVX-LF20 i OVX-LF40) oraz siarę w dawce 0,5 i 1,0 ml/100 g m.c. (OVX-COL5 i OVX-COL10). Masę ciała zwierząt kontrolowano 2 razy w tygodniu i na tej podstawie dobierano odpowiednie dawki podawanych substancji. Zarówno laktoferynę (LF) (rozpuszczoną w płynie fizjologicznym), jak i siarę (COL) podawano codziennie dożołądkowo, za pomocą specjalnych sond (Instech Lab. Inc. USA) przeznaczonych dla szczurów i dobranych do wieku oraz masy ciała zwierząt. Samicom grup kontrolnych SHO i OVX-PHS podawano płyn fizjologiczny w objętości 2 ml/kg m.c. Podczas trwania eksperymentu zwierzętom zapewniono nieograniczony dostęp do wody, natomiast w celu uniknięcia nadmiernego spożycia paszy wywołanego operacjami owariektomii zwierzętom grup OVX podawano taką samą ilość paszy jaką dobowo spożywały szczury grupy SHO. Po 40-dniowym okresie podawania siary lub laktoferyny zwierzęta uśmiercono i wykonano skany całego ciała określając gęstość i zawartość mineralną całego kośćca (tBMD i tBMC) oraz zawartość tkanki mięśniowej (Lean Mass) i tłuszczowej (Fat Mass). Następnie od wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i grup doświadczalnych wyizolowano kości udowe, które poddano badaniu densytometrycznemu, tomograficznemu i wytrzymałościowemu.

Analiza densytometryczna (DXA) całego kośćca wykazała, iż brak oddziaływania hormonów płciowych wywołany obustronną ovariectomią spowodował statystycznie istotne ($p < 0,05$) obniżenie całkowitej gęstości mineralnej (tBMD) w grupie otrzymującej płyn fizjologiczny w stosunku do grupy kontrolnej operowanej rzekomo. Analogiczną sytuację obserwowano także w przypadku całkowitej zawartości mineralnej (tBMC) badanych zwierząt. Również analiza densytometryczna izolowanych kości udowych wykazała istotny spadek obu badanych parametrów (BMD, BMC) w grupie ovariectomizowanej (OVX-PHS) w porównaniu z grupą kontrolną. Kości udowe zwierząt w grupie ovariectomizowanej (OVX-PHS) charakteryzowały się zmniejszoną odpornością na działanie sił mechanicznych, a w konsekwencji większą skłonnością do złamań ze względu na niższe wartości siły maksymalnej i mniejszy moduł Younga. Niekorzystny wpływ operacji ovariectomii był także widoczny w badaniu tomograficznym, gdzie wyraźnie doszło do zmniejszenia parametrów tkanki kostnej gąbczastej takich jak Tb.vBMD i Tb.BMC. Badaniom tomograficznym poddano także tkankę kostną zbitą w 50% długości kości. 100-dniowy okres braku wpływu hormonów płciowych wpłynął na istotne obniżenie średnich wartości całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej kości (Tot.vBMD) o ponad 8%. Równie niekorzystne działanie obserwowano w przypadku wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD) oraz grubości tkanki kostnej zbitej (Ct.Th). Brak oddziaływania sterydowych hormonów płciowych spowodował także intensyfikację resorpcji wewnętrznej powierzchni kości udowych samic, przejawiającą się w zwiększeniu ich obwodu – Endo.C. Analiza densytometryczna i tomograficzna całego kośćca, jak i izolowanych kości udowych szczurów grup ovariectomizowanych otrzymujących różne dawki laktoferyny i siary wykazała wyraźny efekt antyosteopeniczny stosowanych substancji. Zastosowanie COL oraz LF ograniczyło spadek gęstości mineralnej (tBMD) i zawartości mineralnej (tBMC) całego szkieletu, jak i kości udowych we wszystkich grupach doświadczalnych, a uzyskane wyniki pozostawały na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej operowanej rzekomo. Analiza tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej kości udowych wykazała, że zarówno LF, jak i COL zahamowały spadek Tot.BMC, Tot.vBMD, a także Tb.BMC i Tb.vBMD w stosunku do grupy ovariectomizowanej otrzymującej wyłącznie płyn fizjologiczny. Podobną tendencję obserwowano także w przypadku parametrów tomograficznych całkowitego przekroju trzonu kości oraz tkanki kostnej zbitej, to jest średniej wartości całkowitej zawartości mineralnej (Tot.BMC) jak i całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej (Tot.vBMD). Zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej (Ct.BMC), jak i

wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD) wykazały również tendencję do wyższych wartości niż w grupie owariektomizowanej otrzymującej wyłącznie płyn fizjologiczny oraz w grupie kontrolnej operowanej rzekomo. Zastosowanie siary, jak i laktoferyny skutecznie wzmocniło kości udowe badanych zwierząt, co przejawiało się w we wzroście siły maksymalnej (F_{max}) badanej w trójpunktowym teście ugięcia. Szczególnie było to widoczne w grupie otrzymującej laktoferynę w dawce 20 mg/kg m.c oraz w grupie otrzymującej siarę w dawce 1mL/100 g m.c. W obu tych grupach średnie wartości F_{max} były wyższe zarówno w stosunku do grupy OVX-PHS jak i SHO-PHS. Siara i w mniejszym stopniu laktoferyna ograniczyły także przyrosty masa ciała zwierząt poddanych owariektomii w porównaniu z grupą kontrolną operowaną rzekomo. Szczególnie skuteczna okazała się siara podawana w dawce 0,5 mL/100 g m.c., a wyniki w tej grupie były na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. Podobną skuteczność stosowania siary obserwowano także w odniesieniu do tkanki tłuszczowej (Fat Mass).

Obserwowane efekty pozwalają klasyfikować białka mleka w tym laktoferynę jako potencjalne czynniki ochronne mające wpływ na kości, które mogą stanowić cenną suplementację w zapobieganiu i leczeniu schorzeń metabolicznych układu kostnego w tym osteoporozy pomenopauzalnej.

Osteoporoza pomenopauzalna związana z małym stężeniem estrogenów jest najczęściej spotykanym typem osteoporozy u kobiet. Niedobór estrogenów prowadzi do nasilenia procesów resorpcji i utraty tkanki kostnej oraz zaburzenia jej mikroarchitektury co w konsekwencji przyczynia się do wzrostu ryzyka złamań. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach sugerują, że stres oksydacyjny odgrywa dużą rolę w patogenezie tkanki kostnej przyczyniając się do zahamowania formowania osteoblastów i skrócenia długości ich życia, a także zaburza procesy przebudowy kości poprzez zmniejszenie puli osteocytów i nasilenie procesów osteoklastogenezy (52,53). Można więc domniemywać, że zahamowanie stresu oksydacyjnego czyli ograniczenie wpływu wolnych rodników na komórki kostne, a co za tym idzie zahamowanie rozwoju osteoporozy, może być osiągnięte poprzez zastosowanie związków o działaniu antyoksydacyjnym. Kwas liponowy (LA) i jego postać zredukowana kwas dihydroliponowy (DHLLA) występują we wszystkich komórkach pro i eukariotycznych, a w komórkach organizmu ludzkiego LA może być syntetyzowany *de novo*. Obie formy działają jako zmiatacze wolnych rodników, wykazują także zdolność chelatowania jonów metali (cynku, miedzi, ołowiu, manganu) oraz regeneracji zredukowanych postaci innych

drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy takich jak glutation. Zwiększenie poziomu zredukowanego glutationu w komórkach podnosi natomiast poziom regeneracji innych antyoksydantów niskocząsteczkowych – kwasu askorbinowego i tokoferolu (witamina C i E). Kwas dihydroliponowy powoduje także przekształcenie nieaktywnej formy koenzymu Q, dostarczanej z pożywieniem – ubichinonu, w jego formę aktywną ubichinol (54-56). Kwas liponowy cechuje łatwa przyswajalność, przenikanie przez barierę krew-mózg oraz dobra tolerancja przez organizm człowieka. W skojarzeniu z witaminami z grupy B wpływa na metabolizm w komórkach nerwowych, wykazując korzystne działanie w polineuropatii cukrzycowej. U chorych na cukrzycę zmniejsza stężenie glukozy we krwi oraz zwiększa stężenie glikogenu w wątrobie. Ponadto LA ze względu na swoje właściwości jest stosowany jako składnik preparatów ograniczających procesy starzenia oraz w odżywkach i suplementach redukujących tkankę tłuszczową.

Kolejna praca pt: „**Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner**” (Radzki R.P, Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 94, 947-954) dotyczyła oceny skuteczności kwasu liponowego (LA) jako czynnika ograniczającego utratę masy kostnej w warunkach rozwijającej się osteopenii wywołanej obustronną owariektomią. Badania przeprowadzono na 56 samicach szczurów rasy Wistar w wieku około 2,5 miesiąca. Po aklimatyzacji zwierzęta podzielono losowo na dwie grupy i przeprowadzono operację rzekomą (SHO, n=8) oraz operację obustronnej owariektomii (OVX, n=48). Po 7 dniach od wykonania zabiegów szczury grupy OVX podzielono losowo na 2 grupy kontrolne otrzymujące płyn fizjologiczny i 17 β -estradiol oraz 4 grupy doświadczalne otrzymujące różne dawki kwasu liponowego 12,5 mg/kg m.c (OVX-LA12.5), 25 mg/kg m.c (OVX-LA25), 50 mg/kg m.c (OVX-LA50) i 100 mg/kg m.c (OVX-LA100). Grupa SHO otrzymywała płyn fizjologiczny. Po 28-dniowym okresie podawania kwasu liponowego zwierzęta uśmiercono i pobrano krew do dalszych analiz biochemicznych a następnie wykonano oznaczenia densytometryczne w celu określenia gęstości mineralnej (tBMD) i zawartości mineralnej (tBMC) całego szkieletu oraz zawartości tkanki mięśniowej (Lean Mass) i tłuszczowej (Fat Mass). Wyizolowane kości udowe, oczyszczono z tkanek miękkich i poddano dalszym badaniom densytometrycznym, tomograficznym i wytrzymałościowym. Operacje owariektomii w istotny sposób obniżyły masę kości udowych w grupie otrzymującej wyłącznie płyn fizjologiczny w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza masy ciała oraz jego składu wykazała wzrost zawartości tkanki tłuszczowej oraz masy

badanych zwierząt w grupie owariektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny. Brak oddziaływania hormonów pochodzenia gonadального uwidocznił się w pogorszeniu parametrów densytometrycznych takich jak gęstość mineralna (BMD) oraz zawartość mineralna (BMC) zarówno w przypadku całego szkieletu, jak i izolowanych kości udowych. Również negatywnie wpłynęła na odporność kości udowych na działanie sił mechanicznych, co przejawiało się w obniżeniu siły maksymalnej, jak i modułu Young'a. Zastosowanie kwasu liponowego spowodowało istotną poprawę gęstości mineralnej (BMD) jak i zawartości mineralnej (BMC) całego szkieletu w grupach otrzymujących wyższe dawki tj. 50 i 100 mg/kg m.c w porównaniu z grupą kontrolną SHO i OVX otrzymującymi płyn fizjologiczny. Podobną tendencję obserwowano w odniesieniu do izolowanych kości udowych gdzie istotnie wyższe wartości BMD i BMC stwierdzono w grupie otrzymującej kwas liponowy w dawce 50 mg/kg m.c. Wyższe dawki kwasu liponowego ograniczyły także degradację tkanki kostnej gąbczastej, mierzonej przy pomocy metody pQCT. Zawartość mineralna (Tb.BMC) jak i wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMD) pozostawały na zbliżonym poziomie do wartości odnotowanych w grupie SHO. Kwas liponowy w dawce 50 mg/kg m.c nie tylko zahamował resorpcję tkanki kostnej zbitej, ale także stymulował jej formowanie co przejawiało się w wyższych wartościach Ct.Th (wzrost o 3,0%) w porównaniu do grupy SHO. Osteotropowy wpływ kwasu liponowego był także widoczny w badaniach biochemicznych dotyczących osteokalcyny i CTX, w których wyniki z grup otrzymujących wyższe dawki LA pozostawały na poziomie zbliżonym do obserwowanych w grupie SHO. W toku doświadczenia wykazano także korzystny hamujący wpływ kwasu liponowego na przyrosty masy ciała wywołane obustronną owariektomią. Wyższe dawki LA ograniczyły masę ciała do poziomu zbliżonego do grupy SHO, a także spowodowały istotną redukcję tkanki tłuszczowej (Fat Mass) w stosunku do grupy SHO oraz ORX-E2. Otrzymane wyniki potwierdzają sugerowane mechanizmy oddziaływania kwasu liponowego na układ kostny poprzez, między innymi, hamowanie aktywności osteoklastów i zapobieganie w ten sposób utracie gęstości mineralnej kości, co jednocześnie sugeruje możliwość wykorzystania tego związku jako potencjalnego leku w chorobach metabolicznych tkanki kostnej.

Problem zmian kostnych spowodowany brakiem oddziaływania hormonów gonadalnych oraz możliwości ich zapobiegania w warunkach rozwijającej się jak i ustalonej osteopenii podjęto również w pracy pt: **„Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats”** (Radzki R.P, Bieńko M, Pierzynowski SG. *Journal of Bone*

and Mineral Metabolism, 2012, 30, 651-659). Procesy, które zachodzą w żywym organizmie w warunkach niedożywienia lub stresu o podłożu hormonalnym znajdują swoje odzwierciedlenie w obniżeniu produkcji białek oraz ich intensywniejszej degradacji. Schorzenia metaboliczne układu kostnego, jak osteopenia i osteoporoza są przykładem takiego właśnie stresu hormonalnego. Jedną z metod terapii, która może przeciwdziałać lub ograniczyć te niekorzystne zmiany jest podawanie glutaminy i jej metabolitów takich jak kwas glutaminowy oraz alfa-ketoglutaran (AKG).

Kwas alfa-ketoglutarowy (AKG) funkcjonuje w organizmie głównie jako metabolit pośredni cyklu Krebsa oraz absorber jonów amonowych, dzięki czemu pełni istotną rolę w detoksykacji organizmu ze szkodliwego jonu amonowego. Jest również źródłem (prekursorem) kwasu glutaminowego i glutaminy, które stymulują syntezę protein oraz hamują degradację białek tkanki mięśniowej. Glutamina jest ponadto istotnym źródłem energii dla enterocytów.

Znaczenie AKG w metabolizmie tkanki kostnej można rozpatrywać w następujących aspektach: alfa-ketoglutaran jest substratem w jelitowej syntezie proliny (poprzez kwas glutaminowy) oraz wraz z kwasem askorbinowym i jonami Fe^{2+} bierze udział w hydroksylacji proliny do hydroksyproliny, która stanowi około 13% aminokwasów kolagenu kostnego. Hydroksyprolina jest niezbędna w syntezie kolagenu stanowiącego około 90% macierzy organicznej tkanki kostnej. Ilość włókien kolagenowych, ich kształt i ułożenie, a następnie mineralizacja mają kluczowe znaczenie dla wytrzymałości mechanicznej kości na działanie sił obciążających. Podawanie AKG w formie dojelitowej podnosi w surowicy poziomy hormonów takich jak: GH, insulina czy IGF-1. Wiele opracowań naukowych podaje, że IGF-1 oprócz funkcji endokrynnej, pełni również funkcje regulatorowe jako potencjalny mediator niektórych czynników regulujących metabolizm kostny w tym kalcytriolu i PTH. Badania *in vivo* na szczurach wykazały, że IGF-1 podnosi metabolizm i przyspiesza proliferację komórek kostnych, natomiast u pacjentów po przeszczepie nerki obniżał procesy resorpcji kości (57, 58). Alfa-ketoglutaran może także oddziaływać na układ kostny poprzez kwas glutaminowy, a świadczą o tym badania wykazujące obecność receptorów kwasu glutaminowego na osteoblastach i osteoklastach oraz ich rolę w metabolizmie tkanki kostnej (59, 60, 61).

Badania dotyczące wpływu alfa-ketoglutaranu przeprowadzono na 64 samicach szczurów rasy Wistar w wieku 2,5 miesiąca w dwóch układach doświadczalnych obejmujących zwierzęta operowane rzekomo (SHO+PLC - grupa SHO otrzymujące placebo i SHO+AKG - grupa

otrzymująca AKG), jak i owarietomizowane (OVX+PLC - grupy OVX otrzymujące placebo i OVX+AKG - grupa otrzymująca AKG). Operacje rzekome, jak i operacje owarietomii przeprowadzono po okresie 7-dniowej aklimatyzacji na zwierzętach podzielonych losowo. W pierwszym układzie doświadczalnym zarówno roztwór zawierający AKG, jak i placebo (PLC) podawano bezpośrednio po okresie rekonwalescencji związanej z operacjami (rozwój osteopenii), natomiast w drugim przypadku po 60-dniowym okresie rozwoju osteopenii (osteopenia ustalona). Oba roztwory zmieniano codziennie na świeże i podawano *ad libitum* jako płyn do picia, kontrolując jednocześnie dobowe spożycie. W obu układach doświadczalnych czas podawania AKG, jak i PLC wynosił 60 dni. Po tym okresie zwierzęta uśmiercono, pobrano krew do analiz biochemicznych oraz wyizolowano kości piszczelowe, które po oczyszczeniu z tkanek miękkich poddano badaniom densytometrycznym, tomograficznym i wytrzymałościowym. W obu układach doświadczalnych efektem wykonania operacji owarietomii (grupy OVX+PLC) był statystycznie istotny spadek gęstości mineralnej (BMD), jak i zawartości mineralnej (BMC) tkanki kostnej w kościach piszczelowych badanych zwierząt potwierdzony analizą densytometryczną. W pierwszym układzie doświadczalnym z rozwijającą się osteopenią zastosowanie alfa-ketoglutaranu nie tylko zahamowało spadek BMD i BMC w grupie owarietomizowanej ale również spowodowało wzrost wartości badanych parametrów powyżej poziomu obserwowanego w grupie SHO otrzymującej płyn fizjologiczny. W drugim układzie doświadczalnym podawanie AKG zahamowało spadek BMD i BMC, jednakże wartości badanych parametrów były niższe niż w grupie SHO+PLC. Należy także podkreślić, że w obu układach doświadczalnych grupy rzekomo owarietomizowane otrzymujące roztwór alfa-ketoglutaranu wykazywały większe wartości parametrów densytometrycznych niż grupy SHO otrzymujące placebo. Analiza tomograficzna kości piszczelowych w doświadczeniu dotyczącym rozwoju osteopenii dowiodła, że stosowanie AKG istotnie zwiększyło parametry dotyczące tkanki kostnej gąbczastej. W grupie OVX+AKG wartości wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMD), zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC) oraz powierzchni tkanki kostnej gąbczastej (Tb.Ar) były wyższe niż w grupie kontrolnej rzekomo owarietomizowanej, otrzymującej placebo (SHO+PLC). Analiza tkanki kostnej zbitej wykazała natomiast, że stosowanie alfa-ketoglutaranu zahamowało obniżanie się zawartości mineralnej (Ct.BMC), wolumetrycznej gęstości mineralnej (Ct.vBMD) oraz powierzchni tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar). Uzyskane wartości były wyższe niż w grupie OVX+PLC i nieznacznie niższe niż w grupie SHO+PLC. W

doświadczeniu drugim (osteopenia ustalona) wartości parametrów tkanki kostnej gąbczastej również wykazywały tendencję wzrostową w odniesieniu do grupy OVX+PLC, ale były niższe niż w grupie SHO+PLC. Podobną zależność odnotowano w odniesieniu do tkanki kostnej zbitiej. Należy także podkreślić, że zastosowanie AKG poprawiło także parametry wytrzymałościowe tkanki kostnej tj. siłę maksymalną i granicę sprężystości, których wartości wykazywały tendencję wzrostową w stosunku do grupy OVX-PLC w obu układach doświadczalnych. Biochemiczne wskaźniki przebudowy tkanki kostnej są czuymi markerami procesów formowania i resorpcji jakie mają miejsce w przebiegu chorób metabolicznych oraz pozwalają na określenie skuteczności zastosowanej terapii leczenia zmian zanikowych kości. Do najważniejszych wskaźników należą osteokalcyna (OC) - marker osteoblastycznego formowania tkanki kostnej oraz C-końcowy usieciowany telopeptyd kolagenu typu pierwszego (CTX), którego stężenie świadczy o intensywności procesów resorpcyjnych. W obu układach doświadczalnych obserwowano wzrost stężenia OC w osoczu krwi po zastosowaniu AKG, co potwierdza jego działanie osteotropowe oraz świadczy o stymulującym wpływie na wzrost aktywności osteoblastów, a w konsekwencji na formowanie tkanki kostnej. Ochronne działanie AKG na tkankę kostną u szczurów poddanych owariektomii potwierdza także istotne zmniejszenie się stężenia CTX w porównaniu z grupami kontrolnymi otrzymującymi placebo.

Podsumowanie i wnioski

Prezentowane w cyklu prac wyniki dotyczące tkanki kostnej badanej na modelowym gatunku doświadczalnym wyraźnie wskazują, że jest ona wysoce skomplikowaną tkanką podlegającą stale procesom resorpcji i odbudowy. Jest ona także niezwykle wrażliwa na czynniki farmakologiczne, żywieniowe i hormonalne, które wywierają wpływ na procesy jej przebudowy. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować że:

1. długotrwałe podawanie chromu trójwartościowego prowadzi do wystąpienia niekorzystnych zmian w strukturze tkanki kostnej objawiających się zmniejszeniem gęstości i zawartości mineralnej tkanki kostnej, zaburzeniami w strukturze gąbczastej kości, obniżeniem jej odporności na działanie sił obciążających - co może skutkować zwiększoną podatnością na złamania oraz zaburzeniami w składzie ciała przejawiającymi się spadkiem zawartości tkanki mięśniowej i tłuszczowej. Ze względu na fakt, iż chrom trójwartościowy jest stosowany jako suplement diety należy monitorować stan układu kostnego podczas długotrwałego stosowania tej formy chromu.

2. stosowanie diety białkowej opartej w dużej mierze o białko zwierzęce pochodzące od ślimaków jadalnych stanowi ryzyko wystąpienia zmian kostnych zbliżonych w swojej postaci do obserwowanych w zaburzeniach metabolicznych typu osteopenia i osteoporoza, przejawiających się obniżoną gęstością mineralną i zawartością mineralną całego szkieletu, jak i zaburzeniami dotyczącymi kości piszczelowej zarówno w strukturze gąbczastej jak i zbitej. Wykazano również istnienie korelacji między zaburzeniami metabolicznymi kości długich i ich obu struktur oraz kości żuchwy co umożliwia wykorzystanie tych ostatnich w procesie diagnostyki zmian metabolicznych tkanki kostnej. Wykazano także, że dieta oparta wyłącznie o białko pochodzące z mięsa ślimaków jadalnych prowadzi do obniżenia odporności układu kostnego na działanie sił obciążających. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są niezwykle istotne ponieważ w dostępnej literaturze nie znaleziono innych prac dotyczących wpływu takiego rodzaju diety na stan czynnościowy układu kostnego.
3. stan czynnościowy oraz jakość układu kostnego ulegają istotnemu obniżeniu w warunkach niedoboru lub braku hormonów płciowych związanych z naturalnym procesem starzenia się organizmu lub będących skutkiem działań farmakologicznych lub interwencji chirurgicznej, prowadząc do wystąpienia zaburzeń typu osteopenia i osteoporoza. Zastosowanie różnych dawek białek mleka (laktoferyna), kwasu liponowego oraz alfa-ketoglutaranu w warunkach rozwijającej się lub ustalonej osteopenii prowadzi do poprawy jakości układu kostnego poprzez zwiększenie lub ustabilizowanie jego parametrów densytometrycznych (BMD i BMC), parametrów tomograficznych struktur gąbczastych i zbitych oraz wytrzymałości mechanicznej na działanie sił obciążających.
4. zastosowanie omówionych substancji może wyznaczyć nowe, alternatywne metody profilaktyki oraz leczenia schorzeń układu kostnego o różnej etiologii.

Piśmiennictwo

1. Weinstein RS. True strength. *J Bone Miner Res* 2000;15:621-5.
2. Orwoll ES, Oviatt SK, Mann T. The impact of osteophytic and vascular calcifications on vertebral mineral density measurements in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1202-7.
3. Lunt M, Felsenberg D, Reeve J et al. Bone density variation and its effects on risk of vertebral deformity in men and women studied in thirteen European centers: the EVOS Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1883-94.
4. Devogelaer JP. Treatment of bone diseases with bisphosphonates, excluding osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:331-5.
5. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008;83:1032-45.
6. Kauffman RP, Overton TH, Shiflett M, Jennings JC. Osteoporosis in children and adolescent girls: case report of idiopathic juvenile osteoporosis and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:492-504.
7. Rauch F, Cornibert S, Cheung M, Glorieux FH. Long-bone changes after pamidronate discontinuation in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *Bone* 2007;40:821-7.
8. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006;12:6222s-30s.
9. Bembi B, Parma A, Bottega M et al. Intravenous pamidronate treatment in osteogenesis imperfecta. *J Pediatr* 1997;131:622-5.
10. Brummen C, Hamdy NA, Papapoulos SE. Long-term effects of bisphosphonates on the growing skeleton. Studies of young patients with severe osteoporosis. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:266-83.
11. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-34.
12. Ma S, Goh EL, Jin A et al. Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties. *Scientific Reports* 2017;7:1-10.
13. Wainwright S, Phipps K, Stone J. A large proportion of fractures in postmenopausal women occur with baseline bone mineral density T-score -2.5 . *J Bone Miner Res*. 2001;16:155 (abstr).
14. NIH Consensus Conference on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001;285:785.
15. Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 1971;4:155-8.
16. Johnston CC, Jr., Epstein S. Clinical, biochemical, radiographic, epidemiologic, and economic features of osteoporosis. *Orthop Clin North Am* 1981;12:559-69.

17. Gasser JA. Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. *Methods Mol Med* 2003;80:323-41.
18. Schwarz K, Mertz W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch Biochem Biophys* 1959;85:292-5.
19. Vincent JB. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans* 2010;39:3787-94.
20. Witmer CM, Harris R, Shupack SI. Oral bioavailability of chromium from a specific site. *Environ Health Perspect* 1991;92:105-10.
21. Andrews RE, Shah KM, Wilkinson JM, Gartland A. Effects of cobalt and chromium ions at clinically equivalent concentrations after metal-on-metal hip replacement on human osteoblasts and osteoclasts: implications for skeletal health. *Bone* 2011;49:717-23.
22. Junaid M, Murthy RC, Saxena DK. Embryo- and fetotoxicity of chromium in pregestationally exposed mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996;57:327-34.
23. Junaid M, Murthy RC, Saxena DK. Embryotoxicity of orally administered chromium in mice: exposure during the period of organogenesis. *Toxicol Lett* 1996;84:143-8.
24. Kanojia RK, Junaid M, Murthy RC. Chromium induced teratogenicity in female rat. *Toxicol Lett* 1996;89:207-13.
25. McCarty MF. Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. *Med Hypotheses* 1995;45:241-6.
26. De Lucca RC, Dutrey PL, Villarino ME, Ubios AM. Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2009;61:347-52.
27. Soudani N, Ben A, I, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats. *Toxicology and Industrial Health* 2011;27:724-7.
28. Radzki RP, Bienko M, Pierzynowski SG. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2012;30:651-9.
29. Radzki RP, Bienko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. Lipoic acid dose-dependently stimulates bone formation in ovariectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2016;94:947-54.
30. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003;133:855S-61S.
31. Shils M, Shike M, Ross A, Caballero B, Cousins R. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 2006.
32. Devine A, Dick IM, Islam AF, Dhaliwal SS, Prince RL. Protein consumption is an important predictor of lower limb bone mass in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1423-8.
33. Kerstetter JE, Allen LH. Dietary protein increases urinary calcium. *J Nutr* 1990;120:134-6.

34. Reed JA, Anderson JJ, Tylavsky FA, Gallagher PN, Jr. Comparative changes in radial-bone density of elderly female lacto-ovovegetarians and omnivores. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1197S-202S.
35. Kerstetter JE, Allen LH. Protein intake and calcium homeostasis. *Adv Nutr Res* 1994;9:167-81.
36. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Dietary protein affects intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 1998;68:859-65.
37. Kerstetter JE, O'Brien K, Insogna K. Dietary protein and intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 2001;73:990-2.
38. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int* 1995;56:305-10.
39. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1995;10:1087-93.
40. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod* 1997;23:419-22.
41. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003;21:388-95.
42. Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26:130-7.
43. Du M, Wang K, Wu C, Zhang L. Effects of bovine colostrum acid protein on bone loss and hemobiochemistry indexes in rats. *Dairy Sci Technol* 2009;89:449-61.
44. Godden S. Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2008;24:19-39.
45. Kelly GS. Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern Med Rev* 2003;8:378-94.
46. Lee J, Kim HM, Choi H, Hong JH. Effects of Colostrum Basic Protein from Colostrum Whey Protein: increase in osteoblast proliferation and bone metabolism. *Journal of Food Science and Nutrition* 2007;12:1-6.
47. Cornish J. Lactoferrin promotes bone growth. *Biometals* 2004;17:331-5.
48. Cornish J, Callon KE, Naot D et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 2004;145:4366-74.
49. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2549-59.
50. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93-110.
51. Lonnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:293-7.

52. Almeida M. Aging mechanisms in bone. *Bonekey Rep* 2012;1.
53. Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013;54:272-8.
54. Biewenga GP, Dorstijn MA, Verhagen JV, Haenen GR, Bast A. Reduction of lipoic acid by lipoamide dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1996;51:233-8.
55. Kozlov AV, Gille L, Staniek K, Nohl H. Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. *Arch Biochem Biophys* 1999;363:148-54.
56. Nohl H, Gille L, Kozlov AV. Critical aspects of the antioxidant function of coenzyme Q in biomembranes. *Biofactors* 1999;9:155-61.
57. Malyszko J, Malyszko JS, Wolczynski S, Mysliwiec M. Osteoprotegerin and its correlations with new markers of bone formation and bone resorption in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2003;35:2227-9.
58. Moukarzel AA, Goulet O, Salas JS et al. Growth retardation in children receiving long-term total parenteral nutrition: effects of ornithine alpha-ketoglutarate. *Am J Clin Nutr* 1994;60:408-13.
59. Chenu C. Glutamatergic regulation of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:282-4.
60. Chenu C. Glutamatergic innervation in bone. *Microsc Res Tech* 2002;58:70-6.
61. Taylor AF. Osteoblastic glutamate receptor function regulates bone formation and resorption. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:285-90.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora

Po ukończeniu studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w roku 1992 rozpocząłem pracę w Katedrze Entomologii Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) na stanowisku asystenta pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Anasiewicz. Pierwszy okres mojej pracy badawczej obejmował kontynuację zainteresowań związanych z pracą magisterską, którą wykonałem w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Wydziału BiNOZ UMCS w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierzy Gromysz-Kałkowskiej, dotyczącej toksyczności pestycydów dla organizmów bezkręgowych oraz wpływu zanieczyszczeń środowiska na kręgowce. Następnie rozpocząłem badania nad szkodnikami drzew owocowych oraz zapoznałem się z biologią i systematyką owadów z rodziny sówkowatych (*Noctuidae*) w czym wydatnie pomógł mi miesięczny staż naukowy w Katedrze Entomologii Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Nowackiego. Efektem moich zainteresowań badawczych były następujące prace:

1. Wpływ zanieczyszczeń środowiska na zwierzęta bezkręgowce. I. Pestycydy. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Białkowska I., Bieńko M. Przegląd Zoologiczny, 1993, 1-2, 28-36.
2. Skażenia środowiska, a stany patologiczne u kręgowców. Bieńko M. Medycyna Weterynaryjna, 1994, 50, 203-205.
3. Rola krocionogów (*Diplopoda*) w przyrodzie i gospodarce człowieka. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. Przegląd Zoologiczny, 1994, 1-2, 25-34.
4. Krocionóg - wróg czy przyjaciel ?. Bieńko M., Gantner M. Działkowiec, 1995, 10, 38.

Po wygraniu konkursu ogłoszonego przez Dziekana Wydziału Weterynarii Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy) rozpocząłem 1 kwietnia 1995 roku pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynarii (obecnie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej) pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Studzińskiego, gdzie pracuję do chwili obecnej. W roku 1995 ukończyłem roczne studia podyplomowe z zakresu Ochrony środowiska na Wydziale Inżynierii Budowlanej i Sanitarnej Politechniki Lubelskiej. Kontynuacją moich wcześniejszych zainteresowań badawczych były następujące prace wydane już pod afiliacją Katedry Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynarii:

1. Toksyczność wybranych pestycydów dla *Orthomorpha gracilis* C.L.Koch (*Diplopoda*). Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Białkowska I., Bieńko M. Kieleckie Studia Biologiczne, 1995, 8, 43-50.
2. Zmiany hematologiczne w zatruciu pestycydami fosforoorganicznymi. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. Międzynarodowa Sesja Naukowa „Higienizacja wsi”. Wydawnictwo AR, ISBN 83-86761-09-1, 1995, 185-189.
3. Wpływ czynników środowiska na występowanie nowotworów na terenie Lublina i województwa lubelskiego. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P. Międzynarodowa Sesja Naukowa „Higienizacja wsi”. Wydawnictwo AR, ISBN 83-86761-09-1, 1995, 37-43.

Od momentu rozpoczęcia pracy w Katedrze Fizjologii Zwierząt moje zainteresowania naukowe skupiły się na fizjologii układu kostnego, oraz wpływie na jego stan czynnościowy elementów środowiskowych, toksykologicznych, hormonalnych i żywieniowych. W tym też okresie zainteresowałem się badaniem wytrzymałości materiału kostnego na obciążenia mechaniczne. Efektem tych zainteresowań było rozpoczęcie badań nad wpływem związków glinu na układ kostny kurcząt, na które w roku 1998 otrzymałem grant promotorski pt.: „Wpływ glinu na procesy rozwoju, wzrostu i mineralizację układu kostno-szkieletowego u kurcząt brojlerów”. W tym też okresie wspólnie z dr hab. Radosławem P. Radzkiem wdrożyliśmy w Katedrze Fizjologii Zwierząt nowatorskie badania układu kostnego oparte o metodę foto-densytometrii z wykorzystaniem zdjęć Rtg z klinem aluminiowym, która wraz ze specjalistycznym oprogramowaniem komputerowym (Radiograph Workshop) umożliwia ocenę gęstości mineralnej tkanki kostnej (BMD) co w konsekwencji pozwoliło na znacząco lepszą diagnostykę układu kostnego. Przez cały ten okres kontynuowałem współpracę z Zakładem Fizjologii Zwierząt Wydziału BiNOZ UMCS w Lublinie. Wyniki z przeprowadzanych badań były sukcesywnie przedstawiane w formie doniesień na następujących konferencjach:

1. Effect of testosterone on geometrical, mechanical and physical changes in broiler chicken bones. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P., Bobowiec R., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 167.
2. Developmental changes of geometrical, mechanical and physical parameters in broiler chicken bones during the first 10 weeks of life. Studziński T., Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 189.

3. Effect of clenbuterol on mechanical, physical and geometrical changes in broiler chicken bones. Radzki R.P., Bieńko M., Puzio I., Bobowiec R., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 184.
4. Wpływ glinu na zmiany parametrów fizycznych i geometrycznych kości kończyn kurcząt brojlerów. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 39-41, ISBN 83-86841-90-7.
5. Obraz krwi kurcząt brojlerów zatrutowanych glinem. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 148-151, ISBN 83-86841-90-7.
6. Wpływ stosowania fitazy jako dodatku do diety na cechy fizyczne i geometryczne kości kończyn kurcząt brojlerów. Puzio I., Radzki R.P., Bieńko M. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 299-301, ISBN 83-86841-90-7.
7. Wpływ stosowania fitazy jako dodatku do diety na procesy wzrostowe organizmu, ze szczególnym uwzględnieniem układu kostnego kurcząt brojlerów. Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P. VIII Sympozjum Drobiarskie, Polanica Zdrój 1997, ISBN 83-906126-6-6, 46-47.
8. Wpływ glinu na zmiany parametrów fizycznych i geometrycznych kości kurcząt brojlerów. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I. VIII Sympozjum Drobiarskie, Polanica Zdrój 1997, ISBN 83-906126-6-6, 28-30.
9. Bone mineral density (BMD) and blood serum osteocalcin level in broiler chickens after aluminium sulphate treatment. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Studziński T. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 38.
10. The effect of dietary phytase supplementation on bone mineral density of broiler chickens limb bones. Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P., Studziński T. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 155.

11. The effect of β_2 adrenergic receptors stimulation on growth and mineralization of broiler chickens limb bones. Radzki R.P., Bieńko M., Puzio I. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 155.

W roku 2000 obroniłem na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pracę doktorską pt.: „Wpływ glinu na procesy rozwoju, wzrostu i mineralizację układu kostno-szkieletowego u kurcząt brojlerów”, uzyskując tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. Promotorem pracy był prof. dr hab. Tadeusz Studziński.

5.2. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora

Uzyskane w toku pracy doktorskiej wyniki wykazały, że stosowanie siarczanu glinu jako dodatku do wody pitnej od 2 do 56 dnia życia wywarło istotny wpływ na wzrost, rozwój i mineralizację kości kończyn udowych i ramiennych kurcząt brojlerów, powodując obniżenie masy ciała, masy i długości kości zarówno kurek, jak i kogutków, zwłaszcza w pierwszych 4 tygodniach życia. Siarczan glinu obniżył gęstość mineralną kości (BMD) kurcząt oraz zmniejszył parametry wytrzymałościowe tj. wartości siły maksymalnej, sztywność i granicę sprężystości kości udowych i ramiennych kurek i kogutków, szczególnie wyraźnie w 4 tygodniu życia, a słabiej w 6 i 8 tygodniu. Dodatek siarczanu glinu do wody pitnej powiązany był ze wzrostem zawartości glinu w kościach, spadkiem zawartości osteokalcyny w osoczu oraz zmniejszeniem wartości parametrów hematologicznych krwi kurcząt. Wyniki pracy doktorskiej zostały przedstawione w następujących pracach:

1. Morphology and respiratory function of the blood of aluminium intoxicated broiler chickens. I. Red blood cell system. Gromysz-Kałkowska K., Bieńko M., Kanoniuk D., Szubartowska E., Wójcik K. Zoologica Poloniae, 2000, 45, 121-139.
2. Morphology and respiratory function of the blood of aluminium intoxicated broiler chickens. I. White blood cell system. Gromysz-Kałkowska K., Bieńko M., Kanoniuk D., Szubartowska E., Wójcik K. Zoologica Poloniae, 2000, 45, 141-155.
3. Wpływ siarczanu glinu na wytrzymałość tkanki kostnej kurcząt brojlerów. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Kapica M., Studziński T. Medycyna Weterynaryjna, 2005, 61, 950-954.
4. Gęstość mineralna tkanki kostnej oraz poziom osteokalcyny u kurcząt brojlerów w następstwie intoksykacji siarczanem glinu. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Kapica M., Studziński T. Medycyna Weterynaryjna, 2005, 61, 562-566.

Kolejnym etapem moich zainteresowań naukowych było rozszerzenie modelu doświadczeń o zwierzęta laboratoryjne, co było naturalną konsekwencją prowadzenia badań o profilu medycznym. Badania na toksycznością związków glinu były kontynuowane na modelu szczura. Wyniki dotyczące wpływu chlorku glinu na układ kostny zostały wygłoszone podczas sympozjum we Francji:

1. The effects of aluminium chloride on the mechanical and geometric parameters assayed on the model of femur in the rat. Radzki R.P, Bieńko M., Puzio I. III Polish-French Symposium – Animal and Human Growth and Development: Regulatory Mechanism. Paris, 2001.

W wyniku współpracy z dr Beatą Dobieżyńską z Katedry i Kliniki Chirurgii Stomatologicznej i Szcękowo-Twarzowej Akademii Medycznej w Lublinie przedstawione zostało doniesienie:

1. Wpływ glinu na gęstość mineralną kości żuchwy szczurów. Dobieżyńska B., Tomaszewski T., Petkowicz B., Bieńko M. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Chirurgii Jamy Ustnej i Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Białystok, 2003, 311-312.

W kolejnych latach nawiązałem, trwającą do chwili obecnej, współpracę z prof. dr hab. Stefanem G. Pierzynowskim z Department of Cell and Organism Biology Uniwersytetu w Lund w Szwecji oraz z dr hab. Rafałem Filipem z Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie, dotyczącą badań nad alfa-ketoglutaranem (AKG) oraz jego wpływem na układ kostny. Zakres moich badań związanych z układem kostnym został poszerzony o zagadnienia związane z chorobami metabolicznymi o podłożu hormonalnym (osteopenia, osteoporoza) oraz zagadnienia związane z układem pokarmowym i jego wpływem na układ kostny (tzw. oś jelitowo-kostna). W roku 2005 dzięki funduszom otrzymanym w ramach grantu aparaturowego KBN Katedra Fizjologii Zwierząt zakupiła obwodowy ilościowy tomograf komputerowy pQCT Stratec XCT Research Plus (Stratec Medizintechnik, Niemcy) oraz densytometr DXA Norland Excell (Norland, USA) wraz ze specjalistycznym oprogramowaniem do badania zwierząt. Od tego momentu rozpocząłem specjalizację w zakresie badań densytometrycznych i tomograficznych, co pozwoliło na realizację szeregu prac dotyczących wpływu czynników hormonalnych, żywieniowych i farmakologicznych na stan czynnościowy układu kostnego.

W mojej obecnej pracy naukowej można wyróżnić następujące obszary badań (w ramach, których zrealizowano następujące prace; z wyłączeniem prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji):

- Badania dotyczące wpływu hormonów płciowych i ich braku na stan czynnościowy i jakościowy układu kostnego w warunkach rozwojowej i utrwalonej osteopenii realizowane w oparciu o model gonadektomizowanego szczura oraz poszukiwania alternatywnych metod leczenia schorzeń metabolicznych układu kostnego z wykorzystaniem między innymi białek mleka oraz zagadnienia dotyczące szeroko pojętego problemu otyłości i jej wpływu na układ kostny.
 1. Beta-hydroksy-beta-metylomaślan (HMB) - czynnik wpływający na właściwości wytrzymałościowe tkanki kostnej u szczurów. Bieńko M, Radzki R.P, Kapica M, Puzio I, Filip R, Pawłowska M. Med. Weter. 2006, 62, 963-965.
 2. Wpływ ranelinianu strontu na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną kości udowej orchidektomizowanych szczurów. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R. Med. Weter. 2007, 63, 1630-1634.
 3. Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats. Radzki R.P, Bieńko M, Pierzynowski S.G. Scan. J Clinical Lab Invest. 2009, 69, 175-180.
 4. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats after lactoferrin treatment. Bieńko M, Radzki R.P. J Physio. Pharmacol. 2011, 62, S14.2
 5. Zależność pomiędzy tkanką kostną a tkanką tłuszczową. Bieńko M, Lis A, Wolski D, Radzki R.P. Med. Weter. 2016, 72, 217-221.
- Badania dotyczące materiałów kościo-zastępczych (tzw. sztuczna kość) realizowane we współpracy z Zakładem Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zrealizowane prace dotyczyły implantacji kompozytu zawierającego ceramikę wapniowo-fosforanową i polimer glukonowy do kości podudzi u króli nowozelandzkich. Uzyskane wyniki potwierdziły, że testowany kompozyt może stanowić biomateriał wspomagający regenerację tkanki kostnej, a przeprowadzone analizy densytometryczne i tomograficzne wykazały integrację implantu z tkanką kostną oraz wzrost gęstości mineralnej w okresie półrocznego procesu regeneracji ubytku kostnego. Sugeruje to, że oceniany kompozyt może służyć jako materiał do regeneracji ubytków kostnych różnego pochodzenia.
 1. Effect of a carbonated HAP/ β -glucan composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the proximal tibial metaphysis of rabbits. Borkowski L, Pawłowska M, Radzki R.P, Bieńko M, Polkowska I, Belcarz A, Karpiński M, Słowik T, Matuszewski Ł, Ślósarczyk A, Ginalska G. Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl. 2015, 53 60-67.

2. Novel biomaterial for bone defects. *In vivo* experiment with New Zealand rabbits. Borkowski L., Belcarz A, Piersiak T, Pawłowska M, Radzki R.P, Bieńko M, Polkowska I, Karpiński M, Słowik T, Matuszewski Ł, Ślósarczyk A, Ginalska G. ESB 25th European Conference on Biomaterials, Madrid 2013, September 8 -12, Book of Abstracts. Spain 2013.
 3. In vivo mineralization of novel implantable composite flexioss for veterinary orthopedic purposes. Polkowska I, Belcarz A, Radzki R.P, Bieńko M, Ginalska G. Southern European Veterinary Conference, Barcelona 2013, October 17-18, Book of Abstracts, Spain 2013.
- Badania (będące kontynuacją wcześniej rozpoczętych) dotyczące wpływu alfa-ketoglutaranu, w połączeniu z innymi substancjami, na stan jakościowy i czynnościowy układu kostnego w warunkach osteopenii indukowanej gonadektomią lub czynnikami farmakologicznymi.
 1. The protective and therapeutic effect of exclusive and combined treatment with alpha-ketoglutarate sodium salt and ipriflavone on bone loss in orchidectomized rats. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R, Stefan G. Pierzynowski S.G .J. Nutr. Health Aging 2016, 20, 628-636.
 2. Effects of 2-oxoglutaric acid on bone morphometry, densitometry, mechanics, and immunohistochemistry in 9-month-old boars with prenatal dexamethasone-induced osteopenia. Tomaszewska E, Dobrowolski P, Bieńko M, Prost Ł, Szymańczyk S, Zdybel A. Connect. Tissue Res. 2015, 56, 483-492.
 3. Can 2-oxoglutarate prevent changes in bone evoked by omeprazole?. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Radzki R.P, Bieńko M, Wydrych J, Zdybel A, Pierzynowski S.G. Nutrition (Burbank Los Angel. Cty. Calif.) 2013, 29, 556-561.
 4. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Bieńko M, Radzki R.P, Pierzynowski S.G. Brit. J. Nutr. 2013, 110, 651 – 65.
 - Badania dotyczące stresu oksydacyjnego i jego powiązania ze stanem czynnościowym i jakościowym układu kostnego w warunkach osteopenii indukowanej gonadektomią
 1. Erythrocyte antioxidative enzymes in experimentally induced osteopenia in rats. Radzki R.P, Bieńko M, Albera E, Kankofer M. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012, 56, 669-675.

2. Effect of Strontium Ranelate on Femur Densitometry and Antioxidative/Oxidative Status in Castrated Male Rats. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R, Albera E, Kankofer M. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 2009, 36, 193-201.
 3. Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. Marta Kankofer, Radosław P. Radzki, Marek Bieńko, E. Albera. J. Vet. Med. A 2007, 54, 225-229.
- Badania dotyczące wpływu czynników żywieniowych i farmakologicznych na układ kostny zwierząt gospodarskich:
 1. Effects of CLA and *Camelina sativa* seed oil on bone properties in broiler chickens. Puzio I, Jaśkiewicz T, Sagan A, Bieńko M, Graboś D. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012, 56 93-97.
 2. Skeletal response to diet with soya bean seeds used as primary source of protein in growing broiler chickens. Olkowski B, Charuta A, Radzki R.P, Bieńko M, Toczko R. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2016, 100, 731-737.
 3. Effect of sodium butyrate and *Yucca schidigera* extract on bone characteristic in growing pigs. Puzio I, Valverde Piedra J.L, Kapica M, Radzki R.P, Bieńko M, Pawłowska M, Szymańczyk S. J. Vet. Res. 2016, 60, 105-111

Ocena bibliometryczna

- Łączna suma punktów za publikacje, według Wykazu Czasopism Punktowanych MNiSW wynosi - 733
- Sumaryczny Impact Factor (IF) publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi - 35,236
- Indeks Hirscha (h-index) opublikowanych prac według bazy Web of Science (na dzień 09.03.2018) wynosi - 8
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (na dzień 09.03.2018) wynosi - 141

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej, otrzymanych nagrodach oraz działalności popularyzującej naukę znajdują się w załączniku numer 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Pełny wykaz opublikowanych prac naukowych wraz z danymi bibliometrycznymi znajduje się w wykazie przygotowanym przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i stanowiącym załącznik numer 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

26.04.2018 r



SUMMARY OF PROFESSIONAL ACCOMPLISHMENTS

dr n. biol. Marek Bieńko

Department of Animal Physiology
Faculty of Veterinary Medicine
University of Life Sciences in Lublin

Lublin 2018

1. Name and surname.

Marek Bieńko

2. Education and degrees - with the name, place and year of their acquisition and the title of the doctoral thesis.

scientific degree: doctor in biological sciences, Faculty of Biology and Earth Sciences, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, 2000, the title of the doctoral thesis: The influence of aluminium on the processes of development, growth and mineralization of the skeletal system in broiler chickens.

post-graduate studies in environmental protection, Faculty of Construction and Sanitary Engineering, Technical University of Lublin, 1995.

degree: Master of Science in Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, 1992.

3. Information on previous employment in scientific/artistic institutions.

1. October 1, 1992 to March 31, 1995 Department of Entomology, Faculty of Horticulture, University of Agriculture in Lublin, Assistant
2. April 1, 1995 to May 31, 2000 Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Assistant
3. Since June 1, 2000 Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Adjunct

4. Indication of achievements under Art. 16 paragraph 2 of the Act of 14 March 2003 on Academic Degrees and Titles and on Degrees and Title in Art (Journal of Laws of 2016 item 882, as amended in the Journal. of Laws No 2016 item 1311):

4.1. Monothematic series of publications:

Functional status of the skeletal system in the aspect of the influence of selected pharmacological and nutritional factors used in rats, healthy and with experimental osteopenia, examined by densitometric, tomographic and endurance methods.

Publications:

- 4.1.1. Bieńko M, Radzki RP, Wolski D. The peripheral quantitative computed tomographic and densitometric analysis of skeletal tissue in male Wistar rats after chromium sulphate treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2017, 24, 446-452 (IF=0,829, MNiSW=20)

Contribution to authorship: 90%; development of the study concept, conducting research, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, editing of the final version of the manuscript.

- 4.1.2. Radzki RP, Bieńko M, Polak P, Szkucik K, Ziomek M, Ostapiuk M, Bieniaś J. Is the consumption of snail meat actually healthy? An analysis of the osteotropic influence of snail meat as a sole source of protein in growing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2018, 102, 2, e885-e891 (IF=1,244, MNiSW=30)

Contribution to authorship: 70%; development of the study concept, conducting research, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, co-editing of the final version of the manuscript.

- 4.1.3. Bieńko M, Radzki R.P, Wolski D, Dębiak P, Szkucik K, Ziomek M, Gondek M. Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: A densitometric, tomographic and morphometric study. *Medycyna Weterynaryjna*, 2018 DOI:10.21521/mw.6030 (IF=0,161, MNiSW=15)

Contribution to authorship: 80%; development of the study concept, conducting research, development of the research method, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, editing of the final version of the manuscript.

- 4.1.4. Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzki RP, Filip D, Polak P. Densitometric, tomographic and mechanical parameters of the female Wistar rat skeletal system after lactoferrin and colostrum treatment in the condition of gonadectomy-induced osteopenia. *Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72, 580-586. (IF=0,161, MNiSW=15)

Contribution to authorship: 80%; development of the study concept, conducting research, development of the research method, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, editing of the final version of the manuscript.

- 4.1.5. Radzki RP, Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 94, 947-954 (IF=1,822 MNSiW=20)

Contribution to authorship: 75%; development of the study concept, conducting research, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, co-editing of the final version of the manuscript.

4.1.6. Radzki RP, Bieńko M, Pierzynowski SG. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2012, 30, 651-659 (IF=2,219 MNISW=25)

Contribution to authorship: 80%; co-development of the study concept, conducting research, densitometric and statistical analyses, interpretation of the obtained results, co-editing of the final version of the manuscript.

The total score of the 6 papers constituting the monothematic series of publications, per year of publication is:

- according to the Ministry of Science and Higher Education list of scored journals - 125 points
- Summary Impact Factor according to JCR list – 6.436

Photocopies of the publications and co-author statements describing their individual contribution to the preparation of respective papers have been attached.

4.2. Discussion of the scientific goal of the aforementioned scientific publications and the results achieved, together with a discussion of their possible use.

Bones, as metabolically active structures, have a number of important functions in the body. Bone tissue development already begins in the neonatal period, and its metabolic activity is preserved throughout life. At this time, the bone tissue undergoes constant remodelling, which concerns both the size and shape of bones, as well as the internal spatial arrangement of the trabeculae, which ultimately affects their mechanical strength. Changes occurring in the skeletal system during the entire individual life can be divided into the period of fast skeletal development, the period of maturation and reaching peak bone mass and the period of disappearance. The greatest dynamics of changes in the bone tissue metabolism is found during adolescence and at the beginning of adulthood.

Bone remodelling is the most important process in rebuilding of new bone tissue. This process is initiated by osteoclasts, which dissolve damaged fragments of the bone tissue and produce so-called resorptive sinuses, which are then filled with new tissue by osteoblasts. The newly created bone tissue undergoes the mineralization process in 2 stages, which differ from each other, among other factors, by the speed of the process. The physiological balance between the processes of resorption and bone tissue reconstruction causes the bone mass to remain relatively constant (1).

An important task of the bone remodelling process is to remove the material "worn" by cyclic loads and thus having reduced strength. When the frequency and size of loads exceeds the regenerative capacity of the bone tissue (its reconstruction ability), its continuity is ultimately compromised, which first results in the occurrence of microcracks and then fractures. It is commonly believed that the role of compact bone is first and foremost mechanical, while the trabecular bone, in addition to the mechanical function, is also involved in the metabolic process. From a physical point of view, such structure, i.e. the outer "tubular" part reinforced by the internal network of trabecular bone beams, provides the skeleton with maximum efficiency during load transfer and also allows for the greatest savings of building material forming the bone tissue.

The key factors for the remodelling process include hormones such as parathormone, calcitonin, growth hormone, thyroid hormones and sex hormones - androgens and oestrogens. The regulating effect on bone metabolism is also exerted by: active metabolites of vitamin D₃, interleukin, transforming growth factor, insulin-like growth factors I and II, leptin, tumour necrosis factor and interferon.

Diet, minerals and environmental factors are also important elements affecting bone metabolism. They can promote bone formation and slow down its resorption, but they can also adversely effect of accelerating bone resorption and slowing down bone formation.

Research conducted on laboratory animals, especially on rats, which have become a model experimental species, allows for a thorough analysis of changes occurring during the disturbance of the ossification processes. Gonadectomised rats are commonly used to determine the extent of changes in the bone material caused by the lack of sex hormones. This type of experiment is commonly used as the closest animal model for the study of bone loss processes in postmenopausal women and associated osteoporosis. For a long time, osteoporosis was thought to be a disease affecting only women. The fact that it is a disorder also occurring in men was only noted after the analysis of data from epidemiological studies carried out on nearly 10,000 people aged over 50 years, in whom bone fractures of the spine were observed in more than 27% women and 26% men. Although a certain number of fractures in men are defined as post-traumatic, most of the observed cases, especially in old age, represent fractures associated with excessive fragility of bone tissue, similarly to women. It is also significant that osteoporosis in men is rarely diagnosed even after a documented fracture, and they are largely attributed to trauma associated with physical work (2,3).

Because the problem of bone alterations concerns both women and men, there is a need to conduct research on the methods of treating bone alterations also after andropause. The use of the orchietomised rat model thus creates excellent conditions for assessing the effectiveness of various preparations as a way to prevent and treat these conditions.

Currently, the most commonly used medicines of choice, used in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women and men after andropause, are bisphosphonates. They are synthetic analogues of pyrophosphate, which is an endogenous physiological inhibitor of mineralization and has the ability to inhibit the resorption processes. Bisphosphonates bind strongly to hydroxyapatite crystals and can remain in the bones for many years. They selectively accumulate not only in the bone mineralization sites, but also on the surfaces that undergo resorption. During the resorption process, bisphosphonates are released from the bones and partially captured by osteoclasts, impairing their ability to resorb bone tissue.

Therapy with bisphosphonates is the most commonly used method of treatment of bone diseases which are characterized by excessive or unbalanced bone remodelling, during which the activity of osteoclasts and osteoblasts is not strictly interrelated, which leads to excessive bone resorption by osteoclasts. Bisphosphonates are used in cases of postmenopausal osteoporosis (4), glucocorticoid-induced osteoporosis (5) and juvenile osteoporosis (6, 7). They are also used in the presence of bone metastases, Paget's disease or multiple myeloma (7,8). Unfortunately, besides the undoubtedly desired effects, bisphosphonates also demonstrate negative effects. The most common side effect of bisphosphonates is the irritating effect on the gastrointestinal tract - mainly on the oesophagus and gastric mucosa. When used intravenously, the side effect may be an increase in body temperature, inflammatory reactions or renal insufficiency (9, 10). The most serious complications include osteonecrosis of the jaw, which occurs spontaneously following bisphosphonate therapy (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw - BRONJ) or develops in patients receiving these preparations after tooth extraction and other surgical procedures (11). Another negative effect of taking bisphosphonates is their effect on the mechanical strength of bone tissue based on the suggestion that their usage increases the risk of microcracks in bones. Ma et al. (12) published the results of studies conducted in people aged 60-90, which show that the bones of people using bisphosphonates had 24% more microcracks than the bones of patients who did not take them and 54% more than in normally

ageing bones. It should also be kept in mind that anti-osteoporotic medicines only strengthen bones without fully rebuilding them. Hence the necessity to look for alternative methods of treating bone diseases.

The WHO definition of osteoporosis says it is a "systemic skeletal disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue resulting in increased susceptibility to fractures". However, recent epidemiological studies (13) have shown that most low-energy fractures, i.e. osteoporotic fractures, occur in people with normal or only slightly reduced, osteopenic, bone mass. Therefore, the National Institute of Health (NIH) and the National Osteoporosis Foundation (NOF) (14) have defined osteoporosis as "a disease resulting from reduced bone strength, predisposing to fractures". Therefore, it is very reasonable to obtain information on the effects of the applied preparations on the mechanical strength of bone tissue and its resistance to microdamage resulting from static and dynamic loads.

The naturally recurring cyclical loads of the skeleton resulting from the normal motor activity of living organisms, and above all from the ability to move, cause multiple deformations of the bone in the elastic range. To some extent, the deformation of bones related to the applied forces remains proportional, which is in accordance with the Hooke's law (elastic bodies are deformed in proportion to the applied force, and they regain their previous shape when the force ceases). From the point of view of mechanics, we assume that the bones undergo three basic types of deformation, i.e. stretching, compression and shearing (twisting). The tensile force causes elongation, compression force decreases the dimension, and the shear force tends to move one part of the bone relative to the other. All these types of forces can work alone or in various combinations.

Bone strength tests may be carried out on appropriately prepared specimens of particular size and shape or whole bones. In 1971, Burstein and Frankel (15) presented criteria which should be met by endurance tests of isolated bones. In experimental studies, the methods based on dynamic loads in the so-called three- or four-point deflection test are broadly used. They are performed with the use of a special head moving at a constant speed and recording the changes occurring in the test sample. Strength analysis is based on the assessment of a number of parameters, e.g. maximum force at which bone fracture occurs, the elastic limit (at which there are no irreversible changes yet) determining elastic changes in bone tissue as well as Young's modulus and work necessary for fracture. Strength tests of

long bones are carried out in two ways; either on specially cut-out parts of the bone shaft or on whole bones, the latter method being more similar to the simulation of real forces acting on the bone. A common mistake in the analysis of whole bones is to consider them as a "rod" model instead of a "tube" model, which a long bone actually is, due to the inability to determine the actual inner diameter of the bone shaft at the point of operation of the testing machine head. In our own research, the actual geometric cross-sections of the tested bones were determined using pQCT analysis, which enabled the application of the three-point deflection test method (based on the "tube" model), which allows for determining the actual bone tissue resistance to deforming forces, which was also associated with the proprietary modification of the strength analysis tool. For lower jaw bone, a flat sample model was used.

Conventional X-rays are not useful for assessing bone density. Bone decalcification becomes clear only after bone density is reduced by 40% (16). In addition, an X-ray image does not allow a quantitative density assessment. A breakthrough in the diagnostics of the skeletal system was the introduction of densitometric methods enabling the quantitative assessment of the bone mineral density, and in particular the method based on Dual X-ray Absorptiometry - (DXA), which has become the "golden standard" in bone density measurements and is very helpful in detecting diseases such as osteoporosis. In human studies, there are strict recommendations regarding the place of measurement, i.e. the proximal femoral epiphysis, distal radial epiphysis, and lumbar vertebrae. The results obtained from these measurement sites are compared with the value of the mean peak bone mineral density (BMD) and with the mean BMD value considering gender, age and weight of the patient being examined. The result of such a comparison with the "due" values is presented as a percentage (% young adult) or as the number of standard deviations from the mean peak bone mass (T-score) and the number of standard deviations from the value due for a given gender, age and body weight of the patient (Z-score). Unfortunately, in animal studies, this procedure is unhelpful due to the lack of reference databases to which the result obtained during the study could be compared. For the purposes of scientific research (especially of laboratory animals) a special program has been developed that allows for the measurement of the whole skeleton (Total Body Scan) or single bones (Small Subject Scan or Research Scan). Total Body Scan also allows for the measurement of the content of the connective tissue (Lean Mass) and fat tissue (Fat Mass). The results obtained in the densitometric study are expressed as a two-dimensional projection on a plane and converted in respect to either its surface, as Bone Mineral Content - BMC

(expressed in g/cm), or per cm² of the measurement plane, as Bone Mineral Density - BMD (expressed in g/cm²).

Computed tomography, especially Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT), is currently one of the most modern techniques enabling non-invasive measurements of bone density not only in the isolated material but also in vivo. The pQCT method allows for the measurement of the actual density of bone tissue, thereby differentiating the compact and trabecular bone tissue. The pQCT examination also records the data concerning the geometry of the cross-section, the outlines of both bony structures - compact and trabecular - and other information used to calculate the strength characteristics of the bone cross-section. This method is based on the finding that the bone strength is determined by the cortical structure, its distribution on the circumference of the cross-section and its thickness. Predicting the mechanical strength of bone tissue consists in determining, on the basis of Cross Sectional Moment of Inertia (CSMI) measurement, the geometrical shape of the cross-section with respect to the main axes passing through the geometric centre and in relation to it. The second stage is the calculation of the relevant strength indexes (SSI - Strength Strain Index, BSI - Bone Strength Index) using the same reference points (17). Due to the fact that the DXA method also allows for in vivo testing, both methods complement each other perfectly, providing a basis for comprehensive assessment of bone tissue and body composition under the conditions of long-term experiments on laboratory animals.

The combination of modern methods of testing bone mineral density, structural quality, mechanical resistance to loading forces and the methods of biochemical assessment of metabolism are the basis for comprehensive bone system diagnosis in healthy individuals, the impact of environmental, nutritional, pharmacological and hormonal factors, and in the case of metabolic disorders with different underlying causes, which allows not only for a targeted assessment of existing risks, but also for the implementation of treatment.

The results concerning the discussed issues were presented in the works constituting the cycle of publications referred to as the so-called scientific achievement entitled **"Functional status of the skeletal system in the aspect of the influence of selected pharmacological and nutritional factors used in rats, healthy and with experimental osteopenia, examined by densitometric, tomographic and endurance methods"**.

Chromium is an element available in various forms. The most common are trivalent and hexavalent forms. Hexavalent forms have industrial application in tanneries, for the production of printing ink pigments, etc. Due to the wide range of undesirable effects and significant toxicity they cause high environmental hazard for humans and animals. Trivalent forms are most commonly found in food, e.g. yeast, cereal products, dry legume seeds, meat, cheese, eggs. One of the largest chromium contents is cocoa (176 µg/100 g product). Trivalent chromium compounds are also used as food additives and supplements. Chromium is essential for the proper functioning of insulin receptors because it is part (together with nicotinic acid, glycine, cysteine and glutamic acid) of so-called Glucose Tolerance Factor (GFT) (18) although in recent years the existence of GFT itself is raising doubts (19). At the moment, the role of chromium is becoming more and more controversial. In 2014, EFSA (The European Food Safety Authority) clearly stated that chromium is no longer considered as a trace element essential for human and animal health, and the results of its activity should be considered more as a pharmacological effect. At the same time, there is a huge number of various dietary supplements and sports nutritions on the market containing trivalent chromium. In comparison to soft tissues, bones are characterized by a special ability to incorporate some metals into their matrix. One of these metals is chromium, which later may exert an effect on bone metabolism (20). Therefore, the skeletal system can act as a natural bioindicator of environmental pollution. While the negative impact of hexavalent chromium on bone metabolism is well known, there is no information on the long-term effects of the trivalent form (21-24). Therefore, the work **„The peripheral quantitative computed tomographic and densitometric analysis of skeletal tissue in male Wistar rats after chromium sulphate treatment” (Bieńko M., Radzki R.P., Wolski D. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2017, 24, 3, 446–452)**, was aimed at determining the effects of long-term administration of various doses of trivalent chromium on the bone system of rats examined by means of tomographic, densitometric and endurance methods. The research was carried out on 40 healthy male Wistar rats bred at the Medical University in Białystok, about 2.5 months old and with the initial body weight of about 200 ± 10 g. After a 7-day acclimatisation, the animals were randomly divided into 4 groups (1 control group and 3 experimental groups). The experimental group animals were daily administered chromium sulphate dissolved in physiological fluid, intragastrically using a special probe (Instech Lab. USA), in 3 doses adjusted to the animal age and body weight, i.e. 400 µg/kg body weight (CR1

group), 600 µg/kg body mass (CR2 group) and 800 µg/kg body mass (equivalent to 104, 156 and 208 µg/Cr/kg bw). The control group (CON) received an appropriate volume of physiological fluid. The body weight of the animals was controlled twice a week and the doses were adjusted based on these measurements. After a 90-day period of chromium administration, the animals were euthanised, weighed and subjected to densitometry (DXA) to determine the mineral density (tBMD) and mineral content (tBMC) of the entire skeleton, lumbar vertebrae (L2-L4) as well as muscle content (Lean Mass) and fat tissue (Fat Mass). Next, femurs were dissected, which, after cleaning from soft tissues, were subjected to further densitometric, tomographic and endurance tests. By using the peripheral quantitative computed tomography (pQCT) method, the properties of both compact and trabecular bone tissue were examined. In 50% of the entire bone length, the parameters of the total cross-section and compact bone tissue were determined by analysing the total bone mineral content (Tot.BMC), total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD), total bone area (Tot.Ar), cortical bone mineral content (Ct. BMC), cortical volumetric bone mineral density (Ct.vBMD), cortical bone area (Ct.Ar), cortical bone thickness (Ct.Th), peripheral bone circumference (Peri.C), Endo-cortical perimeter (Endo.C) and axis strength index (xSSI). Measurements of the total cross-section of the femoral bones and trabecular bone tissue of the distal metaphyseal part were also performed, analysing the total bone area (Tot.Ar), trabecular bone area (Tb.Ar), total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD), total bone mineral content (Tot.BMC), trabecular volumetric bone mineral density (Tb.vBMD) and trabecular bone mineral content (Tb.BMC). After densitometric and tomographic examinations, the isolated femurs were subjected to a strength test by means of so-called three-point deflection test defining the maximum strength and Young's modulus.

The obtained results indicate that long-term usage of chromium sulphate had a negative effect on some parameters characterising the skeletal system. Densitometric analysis of the entire skeleton showed a statistically significant ($p < 0.05$) drop in both tBMD and tBMC in all experimental groups. The same tendency was observed in the case of a comprehensive analysis of isolated femurs and lumbar vertebrae L2-L4. A detailed tomographic analysis of isolated femurs showed that the metaphyseal part was more susceptible to long-term administration of chromium. The trabecular volumetric bone mineral density was lower in all experimental groups compared to the control groups by 16.2%, 18% and 22.9%, respectively. Also, the trabecular bone mineral content showed statistically lower values in all groups

receiving chromium sulphate (13.7%, 16.5%, 21.8% vs. CON). A similar trend was also observed with respect to total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD), total bone mineral content (Tot.BMC), and total bone area (Tot.Ar). The femoral shaft analysis showed a statistically significant decrease in the total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD) in the CR3 group, which received the highest dose of chromium in comparison to the control group. Changes in bone structure have also been reflected in strength studies. The femoral bones subjected to the three-point deflection test showed statistically significant ($p < 0.05$) reduction in the maximum force and thus the bone resistance to fracture after using all three doses of chromium sulphate. The maximum force in the CR1, CR2 and CR3 groups was respectively: 217.4N, 161.2N and 148.14 N, while in the control group it was 239.2 N. The same statistically significant trend was observed with respect to the Young's modulus. Statistical significance ($p < 0.05$) was also observed with regard to changes in body weight and muscle tissue content (Lean Mass). Chromium administered for 90 days caused the reduction of both analysed parameters in the experimental groups. There was also a reduction in fat content (Fat Mass), however, these changes were not significant.

The potential mechanism of chromium impact on bone tissue was already presented in 1995 (25). The results published in this work are in line with earlier works including De Lucca et al. (26) and Soudani et al. (27), which concerned the negative impact of hexavalent chromium on the skeletal system, manifested by disorders of bone metabolism and formation of new tissue, not only long bones, but also lower jaw. Also, the observations regarding the greater susceptibility of trabecular bone tissue, as compared to cortical bone, to the effects of various factors are consistent with other reports (28, 29).

In recent years, chromium in the form of a dietary supplement is often recommended as a measure to support slimming, increase muscle tissue and reduce body fat. However, the results of research on the effect of chromium supplementation on body mass and composition are not equivocal, and many of them have not shown a significant effect of this supplementation on weight reduction. In the discussed work, the effect of decreasing the content of adipose tissue was visible, however - which may be disturbing - there was also a decrease in the content of muscle tissue. Also, the obtained results regarding the negative impact of chromium on the skeletal system suggest the need to pay closer attention to the trivalent form and to carry out further studies of this form of chromium in terms of its effect on bones. Therefore, it seems reasonable to exercise caution when using chromium

supplementation due to the possibility of harmful effects of this element in case of excessive consumption.

In addition to environmental factors affecting the metabolism of bone tissue, there are also a number of nutritional factors that can modify the condition of the skeletal system.

It should be kept in mind that a properly balanced diet and physical activity reduce the risk of developing metabolic bone diseases. This is especially important during the period of growth and development of the organism, when the skeleton is being built and during its subsequent maturation. Therefore, all factors that negatively affect the skeletal system in this period may have significant consequences in later life and in the old age. Bad eating habits, insufficient calcium intake, deficiency or excessive consumption of protein, phosphorus, sodium and aversion to physical exercise are among the most frequently mentioned reasons, in addition to hormonal and genetic factors, excessive bone loss and osteoporosis. It is well known that the protein contained in food affects the quality of bone material through participation in the synthesis of collagen and other bone matrix proteins, which also indicates the relationship between protein intake and bone mineral density (BMD) (30,31). The recommended values of human protein intake are 0.9 - 1.0 g/kg bw. Smaller intake may have a negative effect on bone mineralization by reducing the absorption of calcium and increasing the secondary increase in the concentration of parathyroid hormone. Davine et al. (32) found a significantly reduced mineral density of femurs in older women consuming too little protein. At the same time, it should be kept in mind that excessive consumption of proteins, especially animal proteins, is one of the factors increasing the risk of osteoporosis (31). Clinical trials show that with the increase of animal protein intake there is an increase in urinary calcium excretion, which at the same time may lead to negative calcium balance, accelerated bone turnover and the development of osteoporosis. With a daily increase in protein intake by 50 g, urinary excretion of calcium is also increased (on average by 50-60 mg), and, according to Kerstetter et al. (33), calcium excretion positively correlates with the intake of animal protein and negatively with the intake of vegetable protein. It is also assumed that people using a vegetarian diet are less susceptible to metabolic bone diseases as opposed to people using a mixed diet, despite a similar level of calcium intake (34). These differences result from the specific properties of sulphuric amino acids, methionine and cysteine, which are present in animal proteins in large amounts. Sulphites that are formed during metabolic processes of these amino acids increase urine acidity, which is a factor increasing glomerular filtration,

which, at the same time, limits reabsorption of calcium in kidney tubules and may stimulate bone resorption by causing the release of basic calcium and magnesium salts with buffering action (33, 35-37).

In recent years, new types of food have appeared on the market. One such food are snails, the consumption of which is systematically growing in Poland, with the global consumption of around 30,000 tons. The most popular species are: big grey snail (*Cornu aspersum maxima*), small grey snail (*Cornu aspersum aspersum*) and Roman snail (*Helix pomatia*), which are obtained from specialized breeding and harvesting. Snail meat is characterized by a relatively high protein content (15-16%), with a relatively low fat content (1.2 to 2.4%). The largest part of snail meat is water, which constitutes about 80%. The snail meat provides full nutritional value in terms of the content of essential amino acids. Their content in Roman snail meat is 45%, while the Cornu species only contains an average of 35.5% of the total amount of amino acids. Snail meat is also characterized by a high content of A and B vitamins and a high content of sodium, potassium and iron.

In two subsequent works entitled: „**Is the consumption of snail meat actually healthy? An analysis of the osteotropic influence of snail meat as a sole source of protein in growing rats (Radzki RP, Bieńko M, Polak P, Szkucik K, Ziomek M, Ostapiuk M, Bieniaś J. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2018, 102, 2, e885-e891)** and „**Influence of snail meat in the diet on mandibular bone loss in male rats: A densitometric, tomographic and morphometric study**” (Bieńko M, Radzki R.P, Wolski D, Dębiak P, Szkucik K, Ziomek M, Gondek M. *Medycyna Weterynaryjna*, 2018 DOI:10.21521/mw.6030) the authors assessed the influence of diet containing proteins from three snail species on the condition of the skeletal system.

The study was conducted on 40 healthy male Wistar rats with an initial weight of approximately 50 grams. After 7 days of acclimatisation, the animals were randomly divided into 3 experimental groups fed with feed, where the source of protein was snail meat from *Cornu aspersum maxima* (CAM group), *Cornu aspersum aspersum* (CAA group) and *Helix pomatia* (HP group) snails and the control group (CON group) fed with feed, where casein was added as the source of protein. After a 28-day feeding period, the animals were euthanised and their blood was collected for biochemical determinations: osteocalcin (OC), carboxy-terminal collagen crosslink type I (CTX-I). Then a full body densitometry was performed, determining the total bone mineral density (tBMD) and total bone mineral content (tBMC) of

the entire skeleton, as well as the content of muscular tissue (Lean Mass) and fat content (Fat Mass). The isolated tibias were examined using the DXA method, pQCT, 3D-microCT and endurance tests. Due to the fact that many scientific works (38-42) have demonstrated a correlation between the bone mineral density (BMD) of the femoral neck and the lumbar spine and the condition of the mandible experimental animals with induced osteopenia and in postmenopausal women. The analysis also involved isolated mandibles to verify the hypothesis that they can serve as indicators of metabolic disorders associated with poor nutrition. To this end, isolated mandibles were subjected to densitometric, tomographic, morphometric and endurance tests. The obtained results are the first showing an osteotropic effect of diet, in which the basic source of protein is snail meat, on the quality of the skeletal system. Densitometric analysis of the whole skeleton showed statistically significant ($p < 0.05$) decrease in bone mineral content (BMC), which, in the case of the entire skeleton and tibia, was most evident in the CAA group. In the case of lower jaw, the lowest BMC values in comparison to the control were observed in the CAM group. The use of a diet containing snail meat also adversely affected mineral density. The CAM group had the lowest BMD values of the entire skeleton and mandible in relation to the control group, and in the case of the tibia, the HP group had the lowest values. Tibias were also subjected to pQCT and 3D- μ CT analysis. The obtained results indicate that the addition of protein derived from snail meat adversely affected both the cortical and trabecular component of the examined tibias. This was manifested, inter alia, in a statistically significant decrease in cortical bone mineral density (Ct.BMC) and cortical volumetric bone mineral density (Ct.vBMD) measured in 50% of the length of the bone shaft, especially in the CAA group. The cortical bone area (Ct.Ar) also decreased significantly. The analysis of the distal metaphyseal part of the tibia showed a decrease in the trabecular bone mineral content (Tb.BMC), especially in the CAA and HP groups. The study using microtomography (3D- μ CT) of the trabecular bone part also demonstrated an unfavourable effect of a diet containing protein derived from snail meat. The thickness of bone beams (Tb.Th - Trabecular Thickness) decreased significantly, especially in the CAA and CAM groups, the number of beams (Tb. N - Trabecular Number) and the distance between individual beams (Tb.Sp - Trabecular Space) increased. The impact of a diet containing meat from three different species of snails, as the main source of protein, was also analysed in the context of its impact on the condition of rat mandibles. Also, in this case, statistically significant ($p < 0.05$) decrease of the tomographic parameters was observed,

concerning both compact and trabecular bone tissue, which was especially clearly visible in the CAM group. The strength tests carried out using the three-point reflection test showed a decrease in mandibular resistance to loads in the maximum force range in the groups receiving the diet with the protein content derived from snails in comparison with the casein-based diet. A morphometric analysis of the mandibles based on X-ray images was also performed. It also showed a decrease in the size and surface area of the tested samples from experimental groups in comparison to the control group. The obtained results related to the diet based on proteins from snail meat are similar to the results obtained in other studies on the negative impact of the lack of sexual hormones on the functional status of the skeletal system and osteopenia caused by this deficiency, which was manifested, inter alia, by a decrease in BMD and BMC, as well as greater susceptibility to load forces. This suggests the need for special caution in the use of such a diet, based largely on proteins from various species of snails, in humans and animals due to the possibility of negative changes, especially since there are no reports in the available literature that describe any impact of the "snail diet" on the skeletal system.

In addition to the environmental and nutritional factors, the quality of the skeletal system is also influenced by hormonal factors, and one of the most common diseases associated with sexual hormone deficiency is osteoporosis characterized by increased bone resorption process resulting in the reduction of bone mass and strength, and the consequence of this is the increased risk of fractures.

In a work entitled „**Densitometric, tomographic and mechanical parameters of the female Wistar rat skeletal system after lactoferrin and colostrum treatment in the condition of gonadectomy-induced osteopenia**” (Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzki R.P, Filip D, Polak P. *Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72, 580-586) the authors assessed the possibility of using colostrum and lactoferrin as factors potentially reducing the negative effect of ovariectomy, and the associated lack of sexual hormones, on the quality of the skeleton in an experiment based on the gonadectomised rat model.

Colostrum, and, in the later period, also milk, constitute a complete and very valuable food for a developing organism. Colostrum is a mammary gland secretion of mammals, accumulated and produced at the end of pregnancy and in the first days after delivery. It provides the newborn with the necessary nutrients and biologically active ingredients, providing an adequate level of protection and stimulation of the immune system. The most

important protein fraction in the colostrum are immunoglobulins, providing the infant with immunity against the pathogenic bacterial flora with which they come into contact after birth. In addition to immunoglobulins, colostrum also contains other proteins, hormones, growth factors (insulin growth factor I and II, TGF alpha, beta1 and beta2, FGF, EGF, GM-CSF, PDGF, VEGF), enzymes and intestinal regulatory peptides as well as a large group of factors with antibacterial activity, prebiotics and probiotics (43-46).

Lactoferrin is a protein found in milk as well as in granularities of neutrophils. It stimulates the proliferation and maturation of osteoblasts, and also reduces their apoptosis by about 50-70%. It inhibits the differentiation of osteoclast precursor cells and the activity of mature osteoclasts, and thus prevents bone resorption (47-51). It also has an indirect protective effect on the skeletal system due to the ability to inhibit osteolytic activity of the cytokines (IL-1 β and TNF- α factor), the concentration of which increases during inflammatory processes.

The conducted studies compared the effectiveness of the influence on bone tissue of colostrum and lactoferrin administered separately in two different doses over a period of 40 days in conditions of established osteopenia caused by bilateral ovariectomy.

The studies were carried out on 36 female Wistar rats aged 9-10 weeks. After acclimatization of the animals to the conditions of the animal lab, they were randomly divided into sham-operated control group (SHO) and 5 groups of rats who underwent bilateral ovariectomy (OVX). All surgical procedures were performed under general anaesthesia. After a 60-day period of inducing osteopenia in the OVX group, the rats were randomly divided into a control group receiving physiological saline (OVX-PHS) and 4 experimental groups receiving: lactoferrin in the doses of 20 and 40 mg/kg bw. (OVX-LF20 and OVX-LF40) and colostrum in the doses of 0.5 and 1.0 ml/100 g bw. (OVX-COL5 and OVX-COL10). The body weight of the animals was controlled twice a week and the appropriate doses of the administered substances were adjusted based on these measurements. Both lactoferrin (LF) (dissolved in the physiological saline) and colostrum (COL) were administered daily, intragastrically, using special probes (Instech Lab. Inc. USA) intended for rats and matched to the age and body weight of animals. The control females in the SHO and OVX-PHS groups received physiological saline a volume of 2 ml/kg bw. During the experiment, animals were provided with unrestricted access to water, while in order to avoid excessive feed intake caused by ovariectomy, OVX animals were given the same amount of feed as was daily consumed by the SHO group.

After a 40-day period of administration of colostrum or lactoferrin, the animals were euthanised and whole-body scans were made, determining total bone mineral density and content (tBMD and tBMC) and muscle (Lean Mass) and fat content (Fat Mass). Subsequently, femurs were isolated from all animals from the control group and experimental groups, which were subjected to densitometric, tomographic and endurance tests.

Densitometric analysis (DXA) of the entire skeleton showed that the lack of sexual hormones caused by bilateral ovariectomy caused statistically significant ($p < 0.05$) reduction of total bone mineral density (tBMD) in the group receiving physiological saline in relation to the sham-operated control group. An analogous situation was also observed in the case of the total bone mineral content (tBMC) of the tested animals. Densitometric analysis of isolated femurs showed a significant decrease in both parameters (BMD, BMC) in the ovariectomised group (OVX-PHS) in comparison to the control group. Femurs in the ovariectomised group (OVX-PHS) were characterized by reduced resistance to mechanical forces and, consequently, a greater tendency to fractures due to lower values of maximum force and a lower Young's modulus. The adverse effect of ovariectomy was also seen in the tomographic examination, where the parameters of trabecular bone tissue such as Tb.vBMD and Tb.BMC were significantly reduced. The tomographic examination also involved cortical bone tissue in 50% of the bone length. The 100-day period of the lack of the effect of sexual hormones led to significant reduction in mean total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD) by more than 8%. An equally unfavourable effect was observed in the case of cortical volumetric bone mineral density (Ct.vBMD) and thickness of cortical bone tissue (Ct.Th). The lack of influence of the sexual hormones also led to the intensification of the resorption of the internal surface of femurs in females, manifesting themselves in the increase of Endo-cortical perimeter - Endo.C. The densitometric and tomographic analysis of the whole skeleton as well as the isolated femoral bones of ovariectomised rats receiving different doses of lactoferrin and colostrum showed a clear antiosteopenic effect of the substances used. The use of COL and LF limited the decrease of the total bone mineral density (tBMD) and bone mineral content (tBMC) of the entire skeleton and femoral bones in all experimental groups, and the obtained results remained at a level similar to the sham-operated control group. Analysis of the trabecular bone tissue of the distal metaphyseal part of the femurs showed that both LF and COL inhibited the decrease in Tot.BMC, Tot.vBMD, as well as Tb.BMC and Tb.vBDM compared to the ovariectomised group receiving only physiological saline. A similar tendency was also

observed in the case of tomographic parameters of the total cross-section of the bone shaft and cortical bone tissue, i.e. the average value of the total bone mineral content (Tot.BMC) as well as the total volumetric bone mineral density (Tot.vBMD). Cortical bone mineral content (Ct. BMC) as well as cortical volumetric bone mineral density (Ct.vBMD) also showed a tendency to higher values than in the ovariectomised group receiving only physiological saline and in the sham-operated control group. The use of colostrum and lactoferrin effectively strengthened femoral bones of the examined animals, which was manifested in the increase in the maximum force (F_{max}) evaluated using the three-point deflection test. This was particularly evident in the group receiving lactoferrin at a dose of 20 mg/kg bw and in the group receiving colostrum at a dose of 1mL/100 g bw. In both groups, the mean F_{max} values were higher both in relation to the OVX-PHS and SHO-PHS groups. Colostrum and, to a lesser extent, lactoferrin also reduced the weight gain of ovariectomised animals as compared to the sham-operated control group. Colostrum, administered at a dose of 0.5 mL/100 g bw, turned out to be particularly effective, and the results in this group were at a level similar to the control group. A similar efficacy of colostrum was also observed in relation to adipose tissue (Fat Mass).

The observed effects allow to classify milk proteins, including lactoferrin, as potential protective factors affecting the bones, which may be a valuable supplement in the prevention and treatment of metabolic disorders of the skeletal system, including postmenopausal osteoporosis.

Postmenopausal osteoporosis associated with low oestrogen concentration is the most common type of osteoporosis in women. Oestrogen deficiency leads to increased resorption and loss of bone tissue as well as disturbances in its microarchitecture, which in turn contributes to an increased risk of fractures. The results of research conducted in recent years suggest that oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of bone tissue, contributing to the inhibition of osteoblast formation and shortening their lifespan. It also disrupts bone remodelling processes by reducing the osteocyte pool and intensifying osteoclastogenesis (52, 53). It can therefore be presumed that the inhibition of oxidative stress, i.e. the limitation of the influence of free radicals on bone cells, and thus the inhibition of the development of osteoporosis, can be achieved by the use of compounds with antioxidant activity. Lipoic acid (LA) and its reduced dihydrolipoic acid form (DHLA) are found in all pro- and eukaryotic cells, and LA can be newly synthesized human body cells. Both forms

act as free radical catchers, they also have the ability to chelate metal ions (zinc, copper, lead, manganese) and regenerate the reduced forms of other small molecule antioxidants such as glutathione. Increasing the level of reduced glutathione in cells, however, increases the level of regeneration of other low-molecular antioxidants - ascorbic acid and tocopherol (vitamin C and E). Dihydrolipoic acid also transforms the inactive form of coenzyme Q, supplied with food - ubiquinone, into its active form ubiquinol (54-56). Lipoic acid is characterized by easy digestibility, penetration through the blood-brain barrier and good tolerance by the human body. In combination with B vitamins, it affects the metabolism in nerve cells, demonstrating beneficial effects in diabetic polyneuropathy. In diabetic patients, it reduces blood glucose levels and increases glycogen concentration in the liver. In addition, due to its properties, LA is used as an ingredient in preparations diminishing the ageing processes and in nutrients and supplements that reduce fat tissue.

Another work entitled „**Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner**” (Radzki R.P, Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2016, 94, 947-954**) regarded the efficiency of lipoic acid (LA) as a factor limiting the loss of bone mass in the condition of developing osteopenia caused by bilateral ovariectomy. The study was conducted on 56 female Wistar rats aged about 2.5 months. After acclimatization, the animals were randomly divided into two groups, sham operated (SHO, n = 8) and subjected to bilateral ovariectomy (OVX, n = 48). Seven days after the surgery, the OVX group rats were randomly divided into 2 control groups receiving either physiological saline or 17 β -oestradiol and 4 experimental groups receiving different doses of lipoic acid: 12.5 mg/kg bw (OVX-LA12.5), 25 mg/kg bw (OVX-LA25), 50 mg/kg bw (OVX-LA50) and 100 mg/kg bw (OVX-LA100). The SHO group received physiological saline. After a 28-day period of lipoic acid administration, the animals were euthanised and blood was collected for further biochemical analyses followed by densitometry to determine the total bone mineral density (tBMD) and total bone mineral content (tBMC) of the entire skeleton as well as muscle (Lean Mass) and fat content (Fat Mass). Next, femurs were dissected, which, after cleaning from soft tissues, were subjected to further densitometric, tomographic and endurance tests. Ovariectomy significantly reduced the weight of femurs in the group receiving only physiological saline in comparison with the control group. The analysis of body weight and its composition showed an increase in the fat tissue and body weight of the examined animals in the ovariectomised group receiving physiological saline.

The lack of influence of hormones of gonadal origin was manifested in deterioration of densitometric parameters such as bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) both for the whole skeleton and isolated femoral bones. It also negatively influenced the resistance of femurs to mechanical forces, which was manifested in the reduction of the maximum strength as well as Young's modulus. The use of lipoic acid resulted in a significant improvement in bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) of the entire skeleton in the groups receiving higher doses, i.e. 50 and 100 mg/kg bw in comparison to the SHO and OVX control groups receiving physiological saline. A similar trend was observed in isolated femoral bones where significantly higher BMD and BMC values were found in the group receiving lipoic acid at a dose of 50 mg/kg bw. Higher doses of lipoic acid also reduced the degradation of trabecular bone tissue, measured using the pQCT method. The trabecular bone mineral content (Tb.BMC) as well as the trabecular volumetric bone mineral density (Tb.vBMD) remained at a similar level to the values recorded in the SHO group. Lipoic acid at a dose of 50 mg/kg bw not only inhibited bone resorption, but also stimulated its formation which was manifested in higher Ct.Th values (increase by 3.0%) in comparison to the SHO group. The osteotropic effect of lipoic acid was also seen in biochemical studies of osteocalcin and CTX, in which the results from the groups receiving higher LA doses remained at a level similar to those observed in the SHO group. The experiment also showed a beneficial inhibitory effect of lipoic acid on weight gain caused by bilateral ovariectomy. Higher doses of LA reduced body weight to the level close to the SHO group, and also caused a significant reduction in body fat (Fat Mass) in relation to the SHO and ORX-E2 groups. The obtained results confirm the suggested mechanisms of lipoic acid influence on the bone system by, inter alia, inhibiting osteoclast activity and thus preventing the loss of bone mineral density, which at the same time suggests the possibility of using this compound as a potential medicine in the treatment of metabolic bone diseases.

The problem of bone alterations caused by the lack of influence of sexual hormones and the possibility of their prevention in the conditions of developing and established osteopenia were also addressed in the work entitled: **„Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats” (Radzki R.P, Bieńko M, Pierzynowski SG. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2012, 30, 651-659)**. Processes that occur in a living organism under conditions of malnutrition or hormone-related stress are reflected in the reduction of protein production and their more intensive degradation. Metabolic disorders of

the skeletal system, such as osteopenia and osteoporosis, are examples of this type of hormonal stress. One of the treatment methods that can counteract or reduce these adverse effects is the administration of glutamine and its metabolites such as glutamic acid and alpha-ketoglutarate (AKG).

Alpha-ketoglutaric acid (AKG) functions in the body mainly as an intermediate metabolite of the Krebs cycle and ammonium ion absorber, thanks to which it plays an essential role in the detoxification of the body from the harmful ammonium ion. It is also a source (precursor) of glutamic acid and glutamine, which stimulate protein synthesis and inhibit the degradation of muscle protein. Glutamine is also an important source of energy for enterocytes.

The importance of AKG in bone tissue metabolism can be considered in the following aspects: alpha-ketoglutarate is a substrate in intestinal proline synthesis (through glutamic acid) and together with ascorbic acid and Fe^{2+} ions it participates in hydroxylation of proline to hydroxyproline, which constitutes about 13% of the bone collagen amino acids. Hydroxyproline is necessary in the synthesis of collagen constituting about 90% of the organic matrix of bone tissue. The amount of collagen fibres, their shape and arrangement, and then mineralization are of key importance for the mechanical resistance of the bone to the loading forces. Enteral administration of AKG increases the serum levels of such hormones as: GH, insulin or IGF-1. Many scientific studies indicate that IGF-1, in addition to the endocrine function, also performs regulatory functions as a potential mediator of certain factors regulating bone metabolism including calcitriol and PTH. *In vivo* studies in rats have shown that IGF-1 increases the metabolism and accelerates bone cell proliferation, while in kidney transplant patients, it lowers bone resorption (57, 58). Alpha-ketoglutarate may also affect the skeletal system through glutamic acid, which is evidenced by studies demonstrating the presence of glutamic acid receptors on osteoblasts and osteoclasts and their role in bone tissue metabolism (59, 60, 61).

Studies on the effects of alpha-ketoglutarate were performed on 64 female Wistar rats aged 2,5 months in two experimental designs including sham-operated animals (SHO + PLC - SHO group receiving placebo and SHO + AKG - SHO group receiving AKG) and ovariectomised animals (OVX + PLC - OVX groups receiving placebo and OVX + AKG - OVX group receiving AKG). The sham operations and ovariectomy operations were carried out after a period of 7 days of acclimatization on randomly divided animals. In the first experimental design, both the AKG

solution and the placebo (PLC) solution were administered immediately after the convalescence period following the operations (development of osteopenia), and in the second case after a 60-day period of osteopenia development (steady-state osteopenia). Every day both solutions were changed to fresh ones and administered ad libitum as a drinking fluid, while simultaneously controlling daily intake. In both experimental designs, the period of administration of AKG and PLC was 60 days. After this period, the animals were euthanised, blood was collected for biochemical analyses and tibias were isolated, which after cleaning from soft tissues were subjected to densitometric, tomographic and endurance tests. In both experimental designs, ovariectomy (OVX + PLC group) resulted in a statistically significant decrease in bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) in tibias of the tested animals, which was confirmed by densitometric analysis. In the first experimental design with developing osteopenia, the use of alpha-ketoglutarate not only inhibited the decrease of BMD and BMC in the ovariectomised group but also increased the value of the examined parameters above the level observed in the SHO group receiving the physiological saline. In the second experimental design, administration of AKG inhibited the decrease of BMD and BMC decrease, however, the values of the tested parameters were lower than in the SHO + PLC group. It should also be emphasized that in both experimental designs, the allegedly ovariectomised groups receiving alpha-ketoglutarate solution showed higher values of densitometric parameters than the SHO groups receiving placebo. Tomographic analysis of tibias in experiments on the development of osteopenia proved that the use of AKG significantly increased the parameters of trabecular bone tissue. In the OVX + AKG group, the values of volumetric bone mineral density of trabecular bone tissue (Tb.vBMD), trabecular bone mineral content (Tb.BMC) and trabecular area (Tb.Ar) were higher than in the ovariectomised control group receiving placebo (SHO + PLC). Analysis of cortical bone tissue revealed that the use of alpha-ketoglutarate inhibited the reduction of cortical bone mineral content (Ct.BMC), cortical volumetric bone mineral density (Ct.vBMD) and the cortical area (Ct.Ar). The obtained values were higher than in the OVX + PLC group and slightly lower than in the SHO + PLC group. In the second experiment (steady-state osteopenia), the values of trabecular bone tissue also showed an upward trend with respect to the OVX + PLC group but were lower than in the SHO + PLC group. A similar correlation was noted with respect to compact bone tissue. It should also be emphasized that the use of AKG also improved the strength parameters of the bone tissue, i.e. the maximum force and the elastic limit, whose

values showed an upward trend in relation to the OVX-PLC group in both experimental designs. Biochemical indicators of bone tissue remodelling are sensitive markers of the formation and resorption processes that take place in the course of metabolic diseases and allow to determine the effectiveness of atrophic bone lesion therapy. The most important indicators include osteocalcin (OC) - osteoblastic bone formation marker and carboxy-terminal collagen crosslink type I (CTX), the concentration of which indicates the intensity of the resorption processes. In both experimental designs, an increase in OC concentration in the blood plasma after AKG application was observed, which confirms its osteotropic effect and shows a stimulating effect on the increase of osteoblast activity and, as a consequence, on the formation of bone tissue. The protective effect of AKG on bone tissue in ovariectomised rats also confirms a significant reduction in CTX concentration compared to placebo-treated control groups.

Summary and Conclusions

The results presented in the series of works regarding bone tissue examined in the model experimental animal species clearly indicate that it is a highly complex tissue that is subject to constant processes of resorption and reconstruction. It is also extremely sensitive to pharmacological, nutritional and hormonal factors that influence its remodelling processes. Based on the obtained results, it can be concluded that:

1. long-term administration of trivalent chromium leads to unfavourable changes in bone structure manifested by a decrease in mineral density and mineral content of bone tissue, disturbances in the trabecular bone structure, reduced immunity to loading forces - which may result in increased susceptibility to fractures and body composition disorders manifested by a decrease in the content of muscle and fat tissue. Due to the fact that trivalent chromium is used as a food supplement, the condition of the skeletal system should be monitored during long-term use of this form of chromium.
2. the use of a protein diet based largely on animal protein derived from edible snails poses a risk of bone alterations similar in their form to those observed in metabolic disorders such as osteopenia and osteoporosis, manifested by reduced mineral density and mineral content of the entire skeleton as well as tibial bone disorders both in trabecular and compact structure. It was also demonstrated that there is a correlation between metabolic disturbances of long bones and both bone structures as well as mandibular bone, which

allows the use of the latter in the diagnosis of metabolic changes in bone tissue. It was also shown that a diet based solely on protein derived from edible snail meat leads to a decrease in the resistance of the skeletal system to the loading forces. It should be emphasized that the obtained results are extremely important because in the available literature we have found no other works on the impact of this type of diet on the functional state of the skeletal system.

3. the functional status and the quality of the skeletal system are significantly reduced in case of deficiency or lack of sexual hormones related to the natural processes of ageing of the organism or resulting from pharmacological or surgical intervention, leading to such disorders as osteopenia and osteoporosis. The use of various doses of milk proteins (lactoferrin), lipoic acid and alpha-ketoglutarate in case of developing or established osteopenia leads to the improvement of bone system quality by increasing or stabilizing its densitometric parameters (BMD and BMC), tomographic parameters of trabecular and cortical structures and mechanical resistance to loading forces.
4. the use of the discussed substances may define new, alternative methods of prophylaxis and treatment of bone diseases of various aetiology.

Literature

1. Weinstein RS. True strength. *J Bone Miner Res* 2000;15:621-5.
2. Orwoll ES, Oviatt SK, Mann T. The impact of osteophytic and vascular calcifications on vertebral mineral density measurements in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1202-7.
3. Lunt M, Felsenberg D, Reeve J et al. Bone density variation and its effects on risk of vertebral deformity in men and women studied in thirteen European centers: the EVOS Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1883-94.
4. Devogelaer JP. Treatment of bone diseases with bisphosphonates, excluding osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:331-5.
5. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008;83:1032-45.
6. Kauffman RP, Overton TH, Shiflett M, Jennings JC. Osteoporosis in children and adolescent girls: case report of idiopathic juvenile osteoporosis and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:492-504.
7. Rauch F, Cornibert S, Cheung M, Glorieux FH. Long-bone changes after pamidronate discontinuation in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *Bone* 2007;40:821-7.
8. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006;12:6222s-30s.
9. Bembi B, Parma A, Bottega M et al. Intravenous pamidronate treatment in osteogenesis imperfecta. *J Pediatr* 1997;131:622-5.
10. Brumsen C, Hamdy NA, Papapoulos SE. Long-term effects of bisphosphonates on the growing skeleton. Studies of young patients with severe osteoporosis. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:266-83.
11. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-34.
12. Ma S, Goh EL, Jin A et al. Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties. *Scientific Reports* 2017;7:1-10.
13. Wainwright S, Phipps K, Stone J. A large proportion of fractures in postmenopausal women occur with baseline bone mineral density T-score -2.5 . *J Bone Miner Res*. 2001;16:155 (abstr).
14. NIH Consensus Conference on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001;6:785.
15. Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 1971;4:155-8.
16. Johnston CC, Jr., Epstein S. Clinical, biochemical, radiographic, epidemiologic, and economic features of osteoporosis. *Orthop Clin North Am* 1981;12:559-69.

17. Gasser JA. Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. *Methods Mol Med* 2003;80:323-41.
18. Schwarz K, Mertz W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch Biochem Biophys* 1959;85:292-5.
19. Vincent JB. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans* 2010;39:3787-94.
20. Witmer CM, Harris R, Shupack SI. Oral bioavailability of chromium from a specific site. *Environ Health Perspect* 1991;92:105-10.
21. Andrews RE, Shah KM, Wilkinson JM, Gartland A. Effects of cobalt and chromium ions at clinically equivalent concentrations after metal-on-metal hip replacement on human osteoblasts and osteoclasts: implications for skeletal health. *Bone* 2011;49:717-23.
22. Junaid M, Murthy RC, Saxena DK. Embryo- and fetotoxicity of chromium in pregestationally exposed mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996;57:327-34.
23. Junaid M, Murthy RC, Saxena DK. Embryotoxicity of orally administered chromium in mice: exposure during the period of organogenesis. *Toxicol Lett* 1996;84:143-8.
24. Kanojia RK, Junaid M, Murthy RC. Chromium induced teratogenicity in female rat. *Toxicol Lett* 1996;89:207-13.
25. McCarty MF. Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. *Med Hypotheses* 1995;45:241-6.
26. De Lucca RC, Dutrey PL, Villarino ME, Ubios AM. Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2009;61:347-52.
27. Soudani N, Ben A, I, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. Oxidative stress induced by chromium (VI) in bone of suckling rats. *Toxicology and Industrial Health* 2011;27:724-7.
28. Radzki RP, Bieńko M, Pierzynowski SG. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2012;30:651-9.
29. Radzki RP, Bieńko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. Lipoic acid dose-dependently stimulates bone formation in ovariectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2016;94:947-54.
30. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003;133:855S-61S.
31. Shils M, Shike M, Ross A, Caballero B, Cousins R. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 2006.
32. Devine A, Dick IM, Islam AF, Dhaliwal SS, Prince RL. Protein consumption is an important predictor of lower limb bone mass in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1423-8.
33. Kerstetter JE, Allen LH. Dietary protein increases urinary calcium. *J Nutr* 1990;120:134-6.

34. Reed JA, Anderson JJ, Tylavsky FA, Gallagher PN, Jr. Comparative changes in radial-bone density of elderly female lacto-ovo vegetarians and omnivores. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1197S-202S.
35. Kerstetter JE, Allen LH. Protein intake and calcium homeostasis. *Adv Nutr Res* 1994;9:167-81.
36. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Dietary protein affects intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 1998;68:859-65.
37. Kerstetter JE, O'Brien K, Insogna K. Dietary protein and intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 2001;73:990-2.
38. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int* 1995;56:305-10.
39. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1995;10:1087-93.
40. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod* 1997;23:419-22.
41. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003;21:388-95.
42. Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 2008;26:130-7.
43. Du M, Wang K, Wu C, Zhang L. Effects of bovine colostrum acid protein on bone loss and hemobiochemistry indexes in rats. *Dairy Sci Technol* 2009;89:449-61.
44. Godden S. Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2008;24:19-39.
45. Kelly GS. Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern Med Rev* 2003;8:378-94.
46. Lee J, Kim HM, Choi H, Hong JH. Effects of Colostrum Basic Protein from Colostrum Whey Protein: increase in osteoblast proliferation and bone metabolism. *Journal of Food Science and Nutrition* 2007;12:1-6.
47. Cornish J. Lactoferrin promotes bone growth. *Biometals* 2004;17:331-5.
48. Cornish J, Callon KE, Naot D et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 2004;145:4366-74.
49. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2549-59.
50. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93-110.
51. Lonnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:293-7.

52. Almeida M. Aging mechanisms in bone. *Bonekey Rep* 2012;1.
53. Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone* 2013;54:272-8.
54. Biewenga GP, Dorstijn MA, Verhagen JV, Haenen GR, Bast A. Reduction of lipoic acid by lipoamide dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1996;51:233-8.
55. Kozlov AV, Gille L, Staniek K, Nohl H. Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. *Arch Biochem Biophys* 1999;363:148-54.
56. Nohl H, Gille L, Kozlov AV. Critical aspects of the antioxidant function of coenzyme Q in biomembranes. *Biofactors* 1999;9:155-61.
57. Malyszko J, Malyszko JS, Wolczynski S, Mysliwiec M. Osteoprotegerin and its correlations with new markers of bone formation and bone resorption in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2003;35:2227-9.
58. Moukarzel AA, Goulet O, Salas JS et al. Growth retardation in children receiving long-term total parenteral nutrition: effects of ornithine alpha-ketoglutarate. *Am J Clin Nutr* 1994;60:408-13.
59. Chenu C. Glutamatergic regulation of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:282-4.
60. Chenu C. Glutamatergic innervation in bone. *Microsc Res Tech* 2002;58:70-6.
61. Taylor AF. Osteoblastic glutamate receptor function regulates bone formation and resorption. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:285-90.

5. Discussion of other scientific and research achievements.

5.1. Scientific achievements before PhD

After graduating from the Faculty of Biology and Earth Sciences of Maria Curie-Skłodowska University in Lublin in 1992, I started working at the Department of Entomology of the Faculty of Horticulture at the University of Agriculture in Lublin (currently University of Life Sciences) as an assistant under the supervision of prof. dr hab. Anna Anasiewicz. In the first period of my research work I continued studies in the area of interest covered in my master's thesis written and defended at the Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Earth Sciences, UMCS in Lublin under the supervision of prof. dr hab. Kazimiera Gromysz-Kałkowska, concerning the toxicity of pesticides to invertebrates and the impact of environmental pollution on vertebrates. Then I started researching pests of fruit trees and got acquainted with the biology and systematics of insects from the family of nocturnal beetles (Noctuidae). An enormously helpful element of this research project was my monthly scientific internship at the Department of Entomology of the Agricultural Academy (now University of Life Sciences) in Poznań under the guidance of prof. dr hab. Janusz Nowacki. The result of my research in this field of interest were the following works:

1. Wpływ zanieczyszczeń środowiska na zwierzęta bezkręgowce. I. Pestycydy. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Białkowska I., Bieńko M. Przegląd Zoologiczny, 1993, 1-2, 28-36.
2. Skażenia środowiska, a stany patologiczne u kręgowców. Bieńko M. Medycyna Weterynaryjna, 1994, 50, 203-205.
3. Rola krocionogów (*Diplopoda*) w przyrodzie i gospodarce człowieka. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. Przegląd Zoologiczny, 1994, 1-2, 25-34.
4. Krocionóg - wróg czy przyjaciel ?. Bieńko M., Gantner M. Działkowiec, 1995, 10, 38.

After winning the competition announced by the Dean of the Department of Veterinary of the University of Agriculture in Lublin (now the Department of Veterinary Medicine of the University of Life Sciences) on April 1, 1995 I began work at the position of assistant at the Chair of Animal Physiology at the Faculty of Veterinary (now the Faculty of Veterinary Medicine) headed by Prof. dr hab. Tadeusz Studziński, where I have worked since. In 1995 I have completed the post-graduate studies in environmental protection at the Faculty of Construction and Sanitary Engineering of the Technical University of Lublin. I continued

exploring my prior research interests, which led to the publication of works issued under the affiliation of the Chair of Animal Physiology at the Faculty of Veterinary:

1. Toksyczność wybranych pestycydów dla *Orthomorpha gracilis* C.L.Koch (*Diplopoda*). Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Białkowska I., Bieńko M. Kieleckie Studia Biologiczne, 1995, 8, 43-50.
2. Zmiany hematologiczne w zatruciu pestycydami fosforoorganicznymi. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. Międzynarodowa Sesja Naukowa „Higienizacja wsi”. Wydawnictwo AR, ISBN 83-86761-09-1, 1995, 185-189.
3. Wpływ czynników środowiska na występowanie nowotworów na terenie Lublina i województwa lubelskiego. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P. Międzynarodowa Sesja Naukowa „Higienizacja wsi”. Wydawnictwo AR, ISBN 83-86761-09-1, 1995, 37-43.

Since I started work at the Department of Animal Physiology, I have focused my scientific interest on the physiology of the skeletal system, and the impact of environmental, toxicological, hormonal and nutritional elements on its functional status. During this period I have got interested in studying the resistance of bone material to mechanical loads. In result, I began my research on the influence of aluminium compounds on the skeletal system of chickens and in 1998 I received a supervisor (research) grant for the research project entitled: “The influence of aluminium on the processes of development, growth and mineralization of the skeletal system in broiler chickens”. During this period, together with dr hab. Radosław P. Radzki, we implemented, in the Department of Animal Physiology, an innovative bone system examination based on the photo-densitometry method using X-ray images with the application of aluminium wedge, which together with specialized computer software (Radiograph Workshop) allows for the assessment of bone mineral density (BMD), which in turn allowed for significantly better diagnostics of the skeletal system. Throughout this period I continued my cooperation with the Department of Animal Physiology, BiNOZ UMCS in Lublin. The results of the conducted research were successively presented in the form of reports at the following conferences:

1. Effect of testosterone on geometrical, mechanical and physical changes in broiler chicken bones. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P., Bobowiec R., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 167.

2. Developmental changes of geometrical, mechanical and physical parameters in broiler chicken bones during the first 10 weeks of life. Studziński T., Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 189.
3. Effect of clenbuterol on mechanical, physical and geometrical changes in broiler chicken bones. Radzki R.P., Bieńko M., Puzio I., Bobowiec R., Śliwa E. XX Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1996, 47, 184.
4. Wpływ glinu na zmiany parametrów fizycznych i geometrycznych kości kończyn kurcząt brojlerów. Bieńko M., Puzio I., Radzki R.P. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 39-41, ISBN 83-86841-90-7.
5. Obraz krwi kurcząt brojlerów zatrutowanych glinem. Gromysz-Kałkowska K., Szubartowska E., Bieńko M. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 148-151, ISBN 83-86841-90-7.
6. Wpływ stosowania fitazy jako dodatku do diety na cechy fizyczne i geometryczne kości kończyn kurcząt brojlerów. Puzio I., Radzki R.P., Bieńko M. 6th International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Wydawnictwo Naukowe WSP, 1997, 299-301, ISBN 83-86841-90-7.
7. Wpływ stosowania fitazy jako dodatku do diety na procesy wzrostowe organizmu, ze szczególnym uwzględnieniem układu kostnego kurcząt brojlerów. Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P. VIII Sympozjum Drobiarskie, Polanica Zdrój 1997, ISBN 83-906126-6-6, 46-47.
8. Wpływ glinu na zmiany parametrów fizycznych i geometrycznych kości kurcząt brojlerów. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I. VIII Sympozjum Drobiarskie, Polanica Zdrój 1997, ISBN 83-906126-6-6, 28-30.
9. Bone mineral density (BMD) and blood serum osteocalcin level in broiler chickens after aluminium sulphate treatment. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Studziński T. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 38.

10. The effect of dietary phytase supplementation on bone mineral density of broiler chickens limb bones. Puzio I., Bieńko M., Radzki R.P., Studziński T. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 155.

11. The effect of β_2 adrenergic receptors stimulation on growth and mineralization of broiler chickens limb bones. Radzki R.P., Bieńko M., Puzio I. XXI Congress of the Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology, 1999, 50, 155.

In 2000 I defended my doctoral thesis at Faculty of Biology and Earth Sciences, Maria Curie-Skłodowska University in Lublin. The title of the doctoral thesis was: "The influence of aluminium on the processes of development, growth and mineralization of the skeletal system in broiler chickens", and was awarded the PhD in Biological Science in the field of biology. The dissertation was supervised by prof. dr. hab Tadeusz Studziński.

5.2. Scientific achievements after PhD

The results obtained during the development of my doctoral thesis showed that the use of aluminium sulphate as an additive to drinking water from the 2nd to 56th day of life had a significant impact on the growth, development and mineralization of femurs and arm bones of the broiler chickens, resulting in the reduction in body weight, bone mass and length in both hens and cocks, especially in the first 4 weeks of life. Aluminium sulphate reduced the bone mineral density (BMD) of chickens and decreased the endurance parameters, i.e. the maximum strength, stiffness and elastic limit of femurs and arm bones in hens and cocks, especially at 4 weeks of age and less articulate at 6 and 8 weeks. The addition of aluminium sulphate to drinking water was associated with an increase in the aluminium content in the bones, a decrease in the content of osteocalcin in plasma and a decrease in the haematological parameters of chicken blood. The results of the doctoral thesis were presented in the following works:

1. Morphology and respiratory function of the blood of aluminium intoxicated broiler chickens. I. Red blood cell system. Gromysz-Kałkowska K., Bieńko M., Kanoniuk D., Szubartowska E., Wójcik K. Zoologica Poloniae, 2000, 45, 121-139.
2. Morphology and respiratory function of the blood of aluminium intoxicated broiler chickens. I. White blood cell system. Gromysz-Kałkowska K., Bieńko M., Kanoniuk D., Szubartowska E., Wójcik K. Zoologica Poloniae, 2000, 45, 141-155.

3. Wpływ siarczanu glinu na wytrzymałość tkanki kostnej kurcząt brojlerów. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Kapica M., Studziński T. *Medycyna Weterynaryjna*, 2005, 61, 950-954.
4. Gęstość mineralna tkanki kostnej oraz poziom osteokalcyny u kurcząt brojlerów w następstwie intoksykacji siarczanem glinu. Bieńko M., Radzki R.P., Puzio I., Kapica M., Studziński T. *Medycyna Weterynaryjna*, 2005, 61, 562-566.

The next stage of my scientific interests was the extension of the experimental model to laboratory animals, which was a natural consequence of conducting medical research. Studies on the toxicity of aluminium compounds were continued on the rat model. The results regarding the influence of aluminium chloride on the skeletal system were presented during a symposium in France:

1. The effects of aluminium chloride on the mechanical and geometric parameters assayed on the model of femur in the rat. Radzki R.P, Bieńko M., Puzio I. III Polish-French Symposium – Animal and Human Growth and Development: Regulatory Mechanism. Paris, 2001.

In result of my cooperation with dr Beata Dobieżyńska from the Chair and Department of Dental and Maxillo-Facial Surgery at the Medical Academy in Lublin, the following report was presented:

1. Wpływ glinu na gęstość mineralną kości żuchwy szczurów. Dobieżyńska B., Tomaszewski T., Petkowicz B., Bieńko M. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Chirurgii Jamy Ustnej i Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Białystok, 2003, 311-312.

In the following years I have established cooperation with prof. dr hab. Stefan G. Pierzynowski from the Department of Cell and Organism Biology at the University in Lund, Sweden and dr hab. Rafał Filip from the Institute of Rural Medicine in Lublin, regarding research on alpha-ketoglutarate (AKG) and its influence on the skeletal system. The scope of my research related to the skeletal system has been extended to include issues related to hormonal metabolic diseases (osteopenia, osteoporosis) and issues related to the digestive system and its effects on the skeletal system (the so-called gut-bone axis).

In 2005, thanks to funds received as part of the KBN instrument grant, the Department of Animal Physiology purchased a peripheral quantitative CT scanner pQCT Stratec XCT Research Plus (Stratec Medizintechnik, Germany) and DXA Norland Excell densitometer (Norland, USA) with specialized software for animal testing. From that moment I began my specialisation in

the field of densitometric and tomographic examinations, which allowed me to elaborate a number of works on the influence of hormonal, nutritional and pharmacological factors on the functional state of the skeletal system.

In my current scientific work, the following areas of research can be distinguished (within the framework of which the following works were carried out, with the exception of the works included in the monothematic series of publications):

- Studies on the influence of sexual hormones and the lack of thereof on the functional and qualitative status of the skeletal system in the developmental and established osteopenia conditions based on the gonadectomised rat model and the search for alternative methods of treating metabolic bone diseases using, among others, milk proteins and issues related to the wider obesity problem and its effect on the skeletal system.
 1. Beta-hydroksy-beta-metyloasmałan (HMB) - czynnik wpływający na właściwości wytrzymałościowe tkanki kostnej u szczurów. Bieńko M, Radzki R.P, Kapica M, Puzio I, Filip R, Pawłowska M. Med. Weter. 2006, 62, 963-965.
 2. Wpływ ranelinianu strontu na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną kości udowej orchidektomizowanych szczurów. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R. Med. Weter. 2007, 63, 1630-1634.
 3. Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats. Radzki R.P, Bieńko M, Pierzynowski S.G. Scan. J Clinical Lab Invest. 2009, 69, 175-180.
 4. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats after lactoferrin treatment. Bieńko M, Radzki R.P. J Physio. Pharmacol. 2011, 62, S14.2
 5. Zależność pomiędzy tkanką kostną a tkanką tłuszczową. Bieńko M, Lis A, Wolski D, Radzki R.P. Med. Weter. 2016, 72, 217-221.
- The research on bone substitute materials (so-called artificial bone) implemented in cooperation with the Department of Biochemistry at the Medical University in Lublin. The works concerned the implantation of a composite containing calcium phosphate ceramics and a glucan polymer to the shin bones of the New Zealand rabbits. The obtained results confirmed that the tested composite may be a biomaterial supporting bone tissue regeneration, and the performed densitometric and tomographic analyses demonstrated implant integration with bone tissue and an increase in mineral density during the semi-

annual regeneration process of the bone defect. This suggests that the evaluated composite can serve as a material for the regeneration of bone defects of various origins.

1. Effect of a carbonated HAP/ β -glucan composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the proximal tibial metaphysis of rabbits. Borkowski L, Pawłowska M, Radzki R.P, Bieńko M, Polkowska I, Belcarz A, Karpiński M, Słowik T, Matuszewski Ł, Ślósarczyk A, Ginalska G. Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl. 2015, 53 60-67.
 2. Novel biomaterial for bone defects. *In vivo* experiment with New Zealand rabbits. Borkowski L., Belcarz A, Piersiak T, Pawłowska M, Radzki R.P, Bieńko M, Polkowska I, Karpiński M, Słowik T, Matuszewski Ł, Ślósarczyk A, Ginalska G. ESB 25th European Conference on Biomaterials, Madrid 2013, September 8 -12, Book of Abstracts. Spain 2013.
 3. *In vivo* mineralization of novel implantable composite flexioss for veterinary orthopedic purposes. Polkowska I, Belcarz A, Radzki R.P, Bieńko M, Ginalska G. Southern European Veterinary Conference, Barcelona 2013, October 17-18, Book of Abstracts, Spain 2013.
- Studies (being a continuation of the previously initiated research) regarding the effect of alpha-ketoglutarate, in combination with other substances, on the qualitative and functional status of the skeletal system in osteopenia conditions induced by gonadectomy or pharmacological agents.
 1. The protective and therapeutic effect of exclusive and combined treatment with alpha-ketoglutarate sodium salt and ipriflavone on bone loss in orchidectomised rats. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R, Stefan G. Pierzynowski S.G. J. Nutr. Health Aging 2016, 20, 628-636.
 2. Effects of 2-oxoglutaric acid on bone morphometry, densitometry, mechanics, and immunohistochemistry in 9-month-old boars with prenatal dexamethasone-induced osteopenia. Tomaszewska E, Dobrowolski P, Bieńko M, Prost Ł, Szymańczyk S, Zdybel A. Connect. Tissue Res. 2015, 56, 483-492.
 3. Can 2-oxoglutarate prevent changes in bone evoked by omeprazole?. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Radzki R.P, Bieńko M, Wydrych J, Zdybel A, Pierzynowski S.G. Nutrition (Burbank Los Angel. Cty. Calif.) 2013, 29, 556-561.

4. The effect of dietary administration of 2-oxoglutaric acid on the cartilage and bone of growing rats. Dobrowolski P, Tomaszewska E, Bieńko M, Radzki R.P, Pierzynowski S.G. Brit. J. Nutr. 2013, 110, 651 – 65.
- Research on oxidative stress and its relation to the functional and qualitative status of the skeletal system in osteopenia induced by gonadectomy
 1. Erythrocyte antioxidative enzymes in experimentally induced osteopenia in rats. Radzki R.P, Bieńko M, Albera E, Kankofer M. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012, 56, 669-675.
 2. Effect of Strontium Ranelate on Femur Densitometry and Antioxidative/Oxidative Status in Castrated Male Rats. Radzki R.P, Bieńko M, Filip R, Albera E, Kankofer M. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 2009, 36, 193-201.
 3. Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. Marta Kankofer, Radosław P. Radzki, Marek Bieńko, E. Albera. J. Vet. Med. A 2007, 54, 225-229.
 - Research on the influence of dietary and pharmacological factors on the bone system of farm animals:
 1. Effects of CLA and *Camelina sativa* seed oil on bone properties in broiler chickens. Puzio I, Jaśkiewicz T, Sagan A, Bieńko M, Graboś D. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2012, 56, 93-97.
 2. Skeletal response to diet with soya bean seeds used as primary source of protein in growing broiler chickens. Olkowski B, Charuta A, Radzki R.P, Bieńko M, Toczko R. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2016, 100, 731-737.
 3. Effect of sodium butyrate and *Yucca schidigera* extract on bone characteristic in growing pigs. Puzio I, Valverde Piedra J.L, Kapica M, Radzki R.P, Bieńko M, Pawłowska M, Szymańczyk S. J. Vet. Res. 2016, 60, 105-111

Bibliometric evaluation

- Total number of points according to the Ministry of Science and Higher Education (MNiSW) - 733
- Total Impact Factor (IF) according to the list of Journal Citation Reports (JCR), per year of publication - 35.236
- Hirsch Index according to Web of Science (WoS) - 8
- Total citation according to Web of Science (WoS) – 141

A list of the published scientific papers and information on didactic achievements, scientific cooperation, awards received and activities promoting science are included in Attachment No. 3 to the Application for Admittance to Habilitation Process.

The full list of published scientific papers along with bibliometric data is included in the list prepared by the Main Library of the University of Life Sciences in Lublin and attached as Attachment No. 2 to the Application for Admittance to Habilitation Process.

26.04.2018 r

A handwritten signature in blue ink, reading "Marek Białko".