

UNIwersytet PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa weterynaria

lek. wet Aleksandra Kimicka-Szajwaj

Rozprawa doktorska

Wpływ czynników żywieniowych na stan układu kostnego szczurów rasy Wistar w warunkach osteopenii wywołanej gonadektomią

Ph.D. thesis title

The influence of nutritional factors on the condition of the skeletal system of Wistar rats under gonadectomy-induced osteopenia

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt

Promotor: dr hab. Marek Bieńko, prof. uczelni
Promotor pomocniczy: dr inż. Monika Ostapiuk

Lublin, 2024

Zał. Nr 2

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

19/06/2024

Podpis promotora



Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data

19/06/2024

Podpis autora

Aleksandra Kimicka-Szajwaj

* niepotrzebne skreślić

Składam serdeczne podziękowania

Panu dr hab. Markowi Bieńko, prof. uczelni mojemu promotorowi

Pani dr inż. Monice Ostapiuk mojemu promotorowi pomocniczemu

oraz Panu prof. dr hab. Radosławowi Radzkiemu za cenne

wskazówki i pomoc w realizacji niniejszej pracy.

Bardzo dziękuję moim Dziadkom za wsparcie i motywację w mojej pracy.

Spis treści

1. Wstęp.....	2
2. Olej arganowy (OA).....	4
2.1. Kwas linolenowy.....	7
2.2. Kwas oleinowy.....	10
2.3. Kwas linolowy.....	11
2.4. Tokoferole.....	12
3. Stres oksydacyjny.....	14
4. Fizjologia tkanki kostnej.....	15
5. Osteoporoza.....	24
6. Złamania osteoporotyczne.....	29
7. Cel pracy.....	32
8. Materiał i metody.....	33
8.1. Densytometryczna analiza gęstości mineralnej i zawartości mineralnej całego szkieletu oraz izolowanych kości udowych z uwzględnieniem szyjki i głowy kości udowej.....	35
8.2. Tomograficzna analiza izolowanych kości udowych z uwzględnieniem szyjki kości udowej.....	36
8.3. Analiza wytrzymałościowa izolowanych kości udowych.....	38
8.4. Badanie biochemiczne.....	39
8.5. Analiza statystyczna uzyskanych wyników.....	40
9. Wyniki.....	40
9.1. Analiza densytometryczna DXA.....	40
Analiza densytometryczna całego szkieletu (Ts.BMD, Ts.BMC, Ts.Area).....	40
Analiza densytometryczna (DXA) całych kości udowych (F.BMD, F.BMC, F.Area).....	43
Analiza densytometryczna (DXA) szyjki kości udowej (S.BMD i S.BMC).....	45
Analiza densytometryczna (DXA) głowy kości udowej (G.BMD i G.BMC).....	47
9.2. Analiza tomograficzna pQCT.....	48
Analiza całkowitego przekroju poprzecznego trzonu izolowanych kości udowych.....	48
Ocena tkanki kostnej zbitej trzonu kości.....	49
Analiza całkowitego przekroju poprzecznego dalszej części przynasadowej kości udowych (Tot.BMC, Tot.vBMD, Tot.Ar).....	51
Analiza tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej kości udowych (Tb.BMC, Tb.vBMD, Tb.Ar).....	52
Analiza tomograficzna szyjki kości udowej.....	54
Parametry przekroju poprzecznego szyjki kości udowej (Tot.BMC, Tot.vBMD, Tot.Ar).....	54
Ocena tkanki kostnej zbitej szyjki kości udowej (Ct.vBMD, Ct.BMC, Ct.Ar, Ct.Th).....	55
Ocena tkanki kostnej gąbczastej szyjki kości udowej (Tb.vBMD, Tb.BMC).....	57
9.3. Analiza wytrzymałościowa tkanki kostnej kości udowych samców szczurów.....	57
Przewidywana wytrzymałość mechaniczna kości udowych samców szczurów (RP-CM-W; xSSI).....	57
Przewidywana wytrzymałość mechaniczna szyjki kości udowej (RP-CM-W; xSSI).....	58
Analiza właściwości wytrzymałościowych kości udowych badana metodą trójpunktowego testu ugięcia.....	58
Parametry wytrzymałościowe kości udowej.....	58
Parametry wytrzymałościowe szyjki kości udowej.....	61
9.4. Parametry biochemiczne wskaźników metabolizmu kostnego.....	64
10. Dyskusja.....	67
11. Wnioski.....	83
12. Piśmiennictwo.....	84
13. Streszczenie.....	97
14. Summary.....	100
15. Spis rycin i tabel.....	103
16. Wykaz użytych skrótów.....	104

1. Wstęp.

Rośliny i pozyskiwane z nich substraty są od wieków stosowane przez ludzi, między innymi w medycynie, kosmetyce oraz przemyśle, a prozdrowotne działanie roślin znane jest od dawna. W zależności od gatunku rośliny, można wykorzystywać jej różne części zarówno w całości, jak i pozyskując z nich ekstrakty, oleje oraz wyciągi.

Stale wydłużająca się długość życia skutkuje występowaniem kolejnych chorób, w tym zaburzeń o charakterze przewlekłym. Powikłania związane z patologiami wynikającymi z wieku mogą trwać dłużej i być bardziej uciążliwe w przebiegu. Dlatego też priorytetem jest poznanie patomechanizmów leżących u podstaw chorób przewlekłych i cywilizacyjnych, tak aby prawidłowo edukować społeczeństwo i móc zapobiegać ewentualnym zaburzeniom. Niestety zdarza się, że zastosowane działania profilaktyczne mogą okazać się niedostateczne, lub też dane procesy patologiczne są niemożliwe do uniknięcia. Jednak znajomość mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia organizmu pozwala na opracowanie odpowiedniej kuracji. Wykorzystanie naturalnej suplementacji w leczeniu i profilaktyce chorób przewlekłych może okazać się szczególnie korzystne dla pacjenta. Substancje, które stosujemy powinny działać multimodalnie, być bezpieczne w stosowaniu, cechować się brakiem skutków ubocznych i działań niepożądanych oraz być łatwe w użyciu. Doskonałym rozwiązaniem jest żywność funkcjonalna oraz dodatki do żywności, które są łatwo dostępne i proste w użyciu, a jednocześnie cechują się dużym potencjałem prozdrowotnym (1).

Codzienny skład pożywienia oraz jakość wybieranych produktów warunkują proporcje dostarczanych kwasów tłuszczowych, białek (zarówno zwierzęcych jak i roślinnych), węglowodanów, substancji mineralnych, witamin oraz innych składników o charakterze bioaktywnym. Ilość poszczególnych składników dostarczanych w miarę regularnie wraz z dietą wpływa więc na stan zdrowia zwierząt i człowieka. Zależność pomiędzy sposobem odżywiania,

rodzajem diety i jej składem, a rozwojem schorzeń o charakterze niezakaźnym stała się szczególnie widoczna w ostatnim stuleciu.

Od wielu lat zyskuje na popularności dieta wegetariańska (2). Wiąże się to z informacjami, że jest ona czynnikiem zmniejszającym ryzyko występowania chorób przewlekłych, w tym cukrzycy (3), choroby niedokrwiennej serca czy też nowotworów (4). Ograniczenie spożywania produktów zwierzęcych ma również przeciwdziałać negatywnym zmianom klimatycznym (5). Jednakże w roku 2022 w czasopiśmie BMC Medicine ukazał się artykuł Webstera i wsp. (6) w którym przedstawiono wyniki badań kohortowych, prowadzonych na terenie Wielkiej Brytanii, dotyczących ponad 26 tysięcy kobiet w wieku 48-53 lat, wśród których wyróżniono osoby regularnie jedzące mięso, jedzące mięso okazjonalnie, peskatarianki¹ oraz wegetarianki. Okazało się, że w ciągu 20 lat, kiedy zaobserwowano 822 przypadki złamań szyjki kości udowej, wegetarianki były jedyną grupą kobiet o podwyższonym, aż o 33% ryzyku złamania. Zdaniem autorów przyczyną tego typu zjawiska może być fakt, iż dieta bezmięsna posiada zmniejszoną zawartość białka, stanowiącego budulec dla mięśni oraz zmniejszoną zawartość wapnia i witaminy B12, co może doprowadzić do obniżenia gęstości mineralnej kości. Zależność taką sugerowały zresztą wcześniejsze badania wykazujące niższe spożycie białka, wapnia, witaminy D i witaminy B12 u wegetarian (7, 8). Konsekwencją takiego stanu będzie zwiększona u wegetarian podatność na złamania kości, w tym na złamania szyjki kości udowej. Jako środek zaradczy postuluje się suplementację witaminą B12, spożywanie większych ilości kwasów tłuszczowych omega-3 oraz zwiększenie aktywności fizycznej (9, 10).

Rozwój cywilizacyjny i technologiczny bardzo wyraźnie zmienił nawyki żywieniowe doprowadzając jednocześnie do ogromnego wzrostu zachorowań na cukrzycę typu 2, nadciśnienie tętnicze, choroby niedokrwienne serca, udary mózgu oraz osteoporozę. Spożywana

¹ Polega na wyłączeniu z diety mięsa czerwonego i białego, a pozostawieniu ryb.

przez człowieka żywność stała się wysoko przetworzoną, w której pojawiła się ogromna ilość środków konserwujących, utrwalaczy, barwników, dodatków i polepszaczy smakowych. Spożywanie takiego typu żywności nie pozostaje bez wpływu na organizm człowieka. Jednym z układów, którego prawidłowy rozwój i stan funkcjonalny zależą w dużej mierze od składu spożywanej diety jest układ kostny, a modyfikujący jego stan wpływ diety jest widoczny przez cały okres życia organizmu (11).

Stosowanie żywności nie przetworzonej, przestrzeganie zrównoważonego bilansu energetycznego oraz aktywność fizyczna skutecznie pozwalają na obniżenie ryzyka wystąpienia chorób określanych mianem cywilizacyjnych. Warto podkreślić, że taka profilaktyka nie niesie ze sobą skutków ubocznych jakie mogą pojawić się w przypadku farmakoterapii, a stosowanie właściwej diety pozwala na obniżenie kosztów późniejszego leczenia.

Dobrym przykładem, substancji naturalnej pochodzenia roślinnego i stosowanej jako dodatek żywieniowy, a nie będącej żywnością wysoko przetworzoną jest olej arganowy.

2. Olej arganowy (OA).

Olej arganowy jest od wieków wykorzystywany przez kobiety z Maroka jako sekret ich urody i piękna, a znany był już od czasów Fenicjan (12). Zaczynając od produkcji, poprzez jego wykorzystanie, olej arganowy jest kluczowym składnikiem tradycyjnych, marokańskich rytuałów pielęgnacyjnych. Uważa się, że ma on działanie lecznicze podczas stosowania miejscowo na trądzik młodzieńczy, blizny powstałe na skutek ospy wietrznej czy zmiany zapalne skóry. Niektóre zabiegi pielęgnacyjne z wykorzystaniem oleju arganowego zdobyły uznanie i popularność na całym świecie. Obecnie powszechnie wykorzystuje się olej arganowy do pielęgnacji włosów oraz dla opóźnienia procesów starzenia się skóry. W ostatnim czasie zdecydowanie zwiększyła się ilość produktów kosmetycznych zawierających w składzie olej arganowy, głównie z powodu jego

właściwości odżywczych i nawilżających. Jest bardzo prawdopodobne, iż wysokie stężenie polifenoli w oleju arganowym zapewnia jego właściwości ochronne i przeciwdziała powstawaniu zmarszczek oraz starzeniu się skóry spowodowanych niszczeniem kolagenu i procesami zapalnymi skóry (13).

Drzewa arganowe (*A. spinosa*), należące do rodziny *Sapotaceae*, endemicznie występują tylko w regionie południowo-wschodnim Maroka. Są one dobrze przystosowane do mało żyznej gleby oraz długich okresów suszy. Orzechy arganowe zawierają w środku od jednego do trzech ziaren (14). Tłoczenie surowych ziaren arganowych na zimno pozwala uzyskać olej kosmetyczny, a tłoczenie na zimno prażonych ziaren arganowych umożliwia pozyskanie jadalnego oleju arganowego (15). Wyróżnia się trzy główne typy technologiczne oleju arganowego (*Argania spinosa* kernel oil) (12): olej jadalny, olej do stosowania zewnętrznego i olej kosmetyczny

Olej arganowy przeznaczony do spożycia jest tłoczony na zimno z prażonych ziaren arganowych, co umożliwia zachowanie wartości odżywczych pozyskiwanego produktu. W wyniku procesu prażenia uzyskuje się orzechowy posmak (16), nadający olejowi arganowemu walorów smakowych. Pierwotnie olej arganowy dodawany był do tradycyjnych potraw, aby wzbogacić ich smak, jednakże obecnie znajduje szerokie zastosowanie w gastronomii, dietach specjalistycznych oraz jako składnik prozdrowotny. Olej arganowy przeznaczony do spożycia posiada wysoką zawartość fitosteroli oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych, dzięki czemu ma potencjał hepatoprotekcyjny oraz kardioprotekcyjny (17). Należy pamiętać, że metoda wytwarzania oleju ma wpływ na jego właściwości prozdrowotne. Przyjmuje się, że OA otrzymywany w wyniku tłoczenia na zimno ma najsilniejsze właściwości przeciwutleniające, natomiast obróbka termiczna je zmniejsza (18).

Wiadomo, że występujące w diecie lipidy, w tym nienasycone kwasy tłuszczowe, mają wpływ na pracę układu immunologicznego. Ich działanie obejmuje sterowanie odpornością

wrodzoną oraz adaptacyjną, łącznie z prezentacją antygenów, proliferacją limfocytów, produkcją cytokin oraz aktywnością granulocytów (19, 20). W oleju arganowym znajduje się około 45% jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, 35% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz 20% nasyconych kwasów tłuszczowych. Olej arganowy jest bogaty w kwasy linolowy, oleinowy i tokoferole, które wykazują silne działanie antyoksydacyjne (21, 22). Kwas oleinowy wpływa na obniżenie ciśnienia tętniczego krwi poprzez regulację struktury błon lipidowych. Stwierdzono również udział OA w hamowaniu aktywności enzymu żelatynazy-A (MMP-2), który jest odpowiedzialny za proliferację nowotworową (23).

Tabela 1. Skład chemiczny oleju arganowego (24).

Kwasy tłuszczowe	[%]	
Kwas oleinowy	43 - 49	
Kwas linolowy	29 - 36	
Kwas palmitynowy	11,5 - 15	
Kwas stearynowy	4,3 - 7,2	
Kwas linolenowy	<0,3	
Tokoferole	[%]	[mg/100 g oleju]
α-tokoferol	2,4 - 6,5	3,5 ± 1
γ-tokoferol	81 - 92	48 ± 0,7
δ-tokoferol	6,2 - 12,8	12,2 ± 1
Sterole	[%]	
Szotenol	44 - 49	
Spinasterol	34 - 44	
8,22-stigmastadien-3β-ol	3,2 - 5,7	
Polifenole	[mg/100g oleju]	
Kwas ferulowy	$(315 \pm 2) \times 10^{-3}$	
Kwas waniliowy	$(67 \pm 3) \times 10^{-4}$	
Kwas syringowy	$(37 \pm 5) \times 10^{-4}$	
Tyrosol	$(12 \pm 1) \times 10^{-4}$	
Węglowodory	[mg/100g oleju]	
Skwalen	313	

Spożywanie oleju arganowego wywiera korzystny wpływ na obniżenie poziomu cholesterolu. Wyniki przeprowadzonych badań przez Berrougui i wsp. (2003) wykazały, że u szczurów z indukowaną hiperlipidemią (indukcja wysokokaloryczną i wysokocholesterolową dietą) po 7 tygodniowym podawaniu oleju w dawce 1 ml/100 g masy ciała dziennie poziom

cholesterolu całkowitego obniżył się o 36%, LDL o 67% trójglicerydów o 31%, a masa ciała o blisko 13%. Nie zmienił się natomiast poziom HDL (25). W kolejnych badaniach w wyniku stosowania oleju arganowego również uzyskano niższe stężenie cholesterolu LDL, cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów w surowicy krwi. Co więcej zaobserwowano niższą peroksydację lipidów oraz wyższe stężenie α -tokoferolu (26-28). Wykazano także, że pozyskany z oleju arganowego ekstrakt fenolowy hamuje utlenianie cholesterolu LDL. W badaniach prowadzonych przez Midaoui i wsp. (2017) stwierdzono przeciwutleniający wpływ oleju arganowego podczas hiperglikemii, insulinooporności oraz przy regulacji ciśnienia krwi u szczurów żywionych glukozą przez 5 tygodni (21). Natomiast u szczurów otyłych, u których stosowano dietę wysokotłuszczową, olej arganowy zredukował wzrost stężenia trójglicerydów w osoczu, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, ograniczył wzrost stężenia markerów peroksydacji lipidów we krwi oraz hamował przyrost trzewnej tkanki tłuszczowej (29). Saponiny obecne w oleju arganowym podawane doustnie w dawce 50-300 mg/kg masy ciała myszom i szczurom wykazywały efekt przeciwbólowy porównywalny z kwasem acetylosalicynowym, a dawka już 10 mg OA obniżała obrzęk łąpy u szczurów wywołany karageniną lub eksperymentalnym zranieniem (30).

2.1. Kwas linolenowy.

Kwas linolenowy występuje w dwóch formach: jako kwas alfa-linolenowy (ALA) oraz gamma-linolenowy (GLA) (31). ALA należy do grupy kwasów omega-3, zaś GLA do omega-6. Oba kwasy nie są produkowane przez organizm człowieka i są dostarczane razem z dietą.

Kwas alfa-linolenowy występuje w produktach roślinnych (orzechach włoskich, rzepaku, roślinach strączkowych, siemieniu lnianym i zielonych warzywach liściastych). Największe stężenie kwasu alfa-linolenowego wykazuje olej lniany oraz olej rzepakowy (32). Kwas ALA jest prekursorem trzech najważniejszych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z rodzaju omega-3: kwasu eikozapentaenowego (EPA), kwasu dokozapentaenowego (DPA) i kwasu

dokozaheksaenowego (DHA). Kwasy tłuszczowe omega-3 wykazują skuteczność w normowaniu hipertriglicydemii i zapobieganiu niewydolności serca (33, 34). Jak podaje Minihane (2016) kwas DHA działa przeciwzakrzepowo, przeciwmiażdżycowo i przeciwartrytmiczne (35). Pierwszym etapem zmian o charakterze miażdżycowym jest pojawienie się procesu zapalnego o charakterze przewlekłym, którego przyczyną jest odpowiedź ścian naczyń na uszkodzenie. Dochodzi też wtedy do dysfunkcji śródbłonna, który z antyadhezyjnego staje się proadhezyjny. Zwiększa się jego przepuszczalność, co ułatwia kumulację LDL w błonie wewnętrznej ściany naczyń. Kolejnym etapem jest oksydacyjna modyfikacja LDL oraz pochłanianie oxLDL przez makrofagi i powstawanie komórek piankowych. Wazoprotekcyjne działanie kwasu DHA polega na przywracaniu funkcji komórek śródbłonna naczyń. DHA moduluje interakcję receptor-agonista, zmniejsza ciśnienie krwi i uszkodzenie narządów (36, 37). Jest również substratem dla związków o potencjale cytoprotekcyjnym i przeciwzapalnym. Jedną z ważniejszych substancji o silnym działaniu neuroprotekcyjnym jest pochodna kwasu dokozaheksaenowego (DHA) - 10,17S-dokozatrien znana pod nazwą neuroprotektyna D1 (NPD1), która między innymi pomaga chronić komórki nerwowe oraz komórki siatkówki po udarze niedokrwiennym mózgu (38). Podanie neuroprotektyny D1 krótko po udarze zwiększa produkcję białka RNF146 (ang. Ring Finger Protein 146, białko Iduna), które stymuluje procesy naprawcze DNA i zapobiega śmierci komórek w wyniku udaru (39). Kwas EPA jest prekursorem eikozanoidów trienowych, do których zalicza się prostacykliny (PGI₃), prostaglandyny (PG₃), tromboksan (TXA₃) oraz leukotrieny (LT₃) [12, 43]. Eikozanoidy należą do hormonów tkankowych, które między innymi regulują ciśnienie krwi oraz pracę układu sercowo-naczyniowego.

Kwasy DHA i EPA są źródłem lipoksyn oraz rezolwin pełniących rolę mediatorów przeciwzapalnych, a z kolei sam DHA jest substratem neuroprotektyny i marezyny. Są to mediatory wygaszające reakcję zapalną (ang. proresolving mediators) poprzez hamowanie

mobilizacji i transmigracji neutrofilów, supresję wydzielania prozapalnych cytokin przez różne komórki obecne w rejonie zapalenia oraz stymulację aktywności fagocytarnej monocytów/makrofagów (40-43). Kwas dokozaheksaenowy (DHA) jest także podstawowym elementem budulcowym błon komórkowych czopków i pręcików siatkówki oka, które odpowiedzialne są za widzenie nocne i barwne (38).

Kwas gamma-linolenowy (GLA) należy do rodziny wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6, będąc produktem pośrednim w biokonwersji kwasu linolowego do kwasu arachidonowego. Jest prekursorem prostaglandyny PGE-1 (44).

Jednym z zagadnień dietetycznych, jest potencjalna profilaktyczna rola kwasu gamma-linolenowego w leczeniu różnych przewlekłych stanów chorobowych. Założenie to opiera się na zdolności diety do modyfikowania składu lipidów komórkowych i biosyntezie eikozanoidów (cyklooksygenazy i lipoksygenazy) (45). Stwierdzono skuteczność GLA w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (46). Pacjenci z reumatoidalnym zapaleniem stawów i czynnym zapaleniem błony maziowej byli leczeni przy pomocy GLA (1,4-2,8 g/ dobę) przez okres 12 miesięcy. Wykazano u nich postępującą poprawę, co sugeruje, że GLA może być skuteczny jako wolno działający lek przeciwreumatyczny modyfikujący przebieg choroby. Stosowanie GLA jako łagodnej terapii wspomagającej jest istotne, ponieważ pacjenci z reumatoidalnym zapaleniem stawów narażeni są na wysokie ryzyko powikłań żołądkowo-jelitowych po zastosowaniu tradycyjnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych i kortykosteroidów (47).

Przeprowadzone badania wykazały, że kwas linolenowy może hamować stres oksydacyjny poprzez obniżenie peroksydacji lipidów osocza, lipoprotein i lipidów błony komórkowej erytrocytów i zwiększenie stężenia enzymów antyoksydacyjnych (45, 48-52). Co więcej wykazano, że izomery kwasu linolenowego są silnymi supresorami wzrostu wielu komórek nowotworowych u ludzi (53). Dowiedziono również, że kwas linolenowy zmniejsza peroksydację

lipidów osocza, peroksydację lipoprotein oraz peroksydację lipidów błony komórkowej erytrocytów (45, 51, 52).

2.2. Kwas oleinowy.

Kwas oleinowy należy do grupy mononienasyconych kwasów tłuszczowych grupy omega-9, jest *cis*-izomerem kwasu elaidynowego. Kwas oleinowy to jeden z najbardziej rozpowszechnionych kwasów tłuszczowych występujących w żywności. Największym źródłem kwasu oleinowego jest oliwa z oliwek, a także olej z orzechów, olej rzepakowy, arganowy, olej z makadamii, tran z wątroby ryb dorszowatych (54). Od wielu lat postuluje się ograniczenie spożywania nasyconych kwasów tłuszczowych na korzyść nienasyconych, a zwłaszcza mononienasyconych, do których zaliczamy kwasy omega-9. Najbardziej znaną właściwością kwasu oleinowego jest wpływ na układ krążenia i zmniejszenia ryzyka rozwoju choroby wieńcowej serca. Kwas oleinowy redukuje nadciśnienie tętnicze (44). Jak wynika z badań Perdomo i wsp. (2015) estry kwasu aktywnie zapobiegają rozwojowi arteriosklerozy i zawałom serca, obniżają stężenie cholesterolu całkowitego, LDL i trójglicerydów (55). Działanie kwasu oleinowego w organizmie sprzyja hamowaniu wczesnych patomechanizmów w aterogenezie na skutek sterowania aktywnością śródbłonna naczyniowego (56). Jest to spowodowane faktem, iż posiłek zawierający dużą zawartość kwasu oleinowego reguluje stężenie poposiłkowe cząsteczek adhezyjnych komórek naczyniowych 1 (VCAM-1 – ang. Vascular cell adhesion molecule-1) oraz cząsteczek adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1 – ang. Intercellular adhesion molecule-1) (57).

Uważa się, iż kwas oleinowy wykazuje pozytywne działanie przeciwzapalne, zwłaszcza w przebiegu chorób autoimmunologicznych (58, 59). Przeprowadzone badania wykazały właściwości stymulujące układ odpornościowy i działanie ochronne w kontekście raka piersi (60-63). Potwierdzono również skuteczność kwasu oleinowego w gojeniu ran (54).

Kwasy omega-9 są składnikiem tzw. diety śródziemnomorskiej, w której głównym źródłem tłuszczu jest oliwa z oliwek (44, 50, 64). Uważa się, że ten rodzaj diety zmniejsza ryzyko chorób nowotworowych i naczyniowych (65, 66). Badanie wskazują również na zmniejszoną częstotliwość występowania chorób przewlekłych takich jak choroba Parkinsona (67, 68). Kwasy omega-9, w tym kwas oleinowy, chronią organizm przed insulinoopornością i zapobiegają dysfunkcji śródbłonna w odpowiedzi na stan prozapalny. Stwierdzono również ich udział w zmniejszaniu proliferacji i apoptozy komórek mięśni gładkich naczyń, co wskazuje na ich korzystną rolę w profilaktyce miażdżycy (69). Ponadto kwasy omega-9 zmniejszają uwalnianie cytokin, zwiększają właściwości niszczące neutrofilów, co poprawia eliminację patogenów z organizmu (70).

2.3. Kwas linolowy

Kwas linolowy należy do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych grupy omega-6. Jest niezbędnym nienasyconym kwasem tłuszczowym (NNKT) co oznacza, że nie jest wytwarzany w organizmie i musi być dostarczany razem z dietą, a jego podaż jest bardzo istotna (71). Szczególnie ważny jest stosunek w diecie kwasów omega-6 do omega-3, który powinien wynosić 4-5:1. Zbyt duże spożycie kwasów omega-6 w tym kwasu linolowego w stosunku do omega-3 może skutkować większą skłonnością do powstawania stanów zapalnych w organizmie (71).

Kwas linolowy w organizmie pod wpływem enzymów jest przekształcany do kwasu gamma-linolenowego, z którego w wyniku dalszych procesów powstaje kwas arachidonowy również należący do rodziny omega-6. Jest on składnikiem budulcowym fosfolipidów wchodzących w skład błon komórkowych neuronów i fotoreceptorów siatkówki oka (71). Kwas arachidonowy jest prekursorem hormonów tkankowych między innymi gastryny, cholecystokininy i sekretyny. Jest

również prekursorem prostacykliny I₂ (PGL₂), która działa rozkurczowo na naczynia krwionośne, obniża ciśnienie krwi i hamuje agregację trombocytów (71).

Wykazano, że spożywanie kwasu linolowego skutkuje zmniejszeniem zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie i zwiększeniem beztłuszczowej masy ciała co może być pomocne w leczeniu otyłości (72). Kwas linolowy zmniejsza zawartość LDL i trójglicerydów, podwyższa natomiast poziom HDL co przynosi korzystne efekty w profilaktyce przeciwmiażdżycowej obniżając jednocześnie ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca (72). W badaniach Mahendran i wsp. (2014) wykazano, że odpowiednia podaż kwasu linolowego skutkuje lepszą kontrolą glikemii, a sam kwas zwiększa wytwarzanie adiponektyny (73). Należy pamiętać, że spadek stężenia adiponektyny – hipoadiponektynemia, jest czułym wskaźnikiem poprzedzającym rozwój otyłości, nadciśnienia tętniczego, zmian naczyniowych, insulinooporności i cukrzycy typu 2 u dorosłych i dzieci (74).

2.4. Tokoferole.

Olej arganowy jest bogaty w tokoferole (α - β - γ - δ -tokoferole), które występują również w orzechach, oleju z oliwek, oleju słonecznikowym. Ze względu na właściwości antyoksydacyjne tokoferoli ich obecność w diecie jest korzystna dla zdrowia i prawidłowego funkcjonowania organizmu (75, 76).

W oleju arganowym najwięcej występuje γ -tokoferolu (około 48 mg/100 g oleju). Gamma tokoferol i jego metabolit γ -karboksyetylo-hydroksychroman wykazują hamujący wpływ na COX-2 (izoenzym cyklooksygenaza-2) ulegający aktywacji podczas wystąpienia reakcji zapalnej, a zahamowanie syntezy COX-2 skutkuje zmniejszeniem objawów stanu zapalnego (77). Tokoferole wykazują również korzystny wpływ na układ immunologiczny, a γ -tokoferol sprawdza się w profilaktyce chorób serca i nowotworach prostaty (16, 23). Tokoferole i tokotrienole, jako witamina E, są niezwykle istotne w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Jej niedobór może

prowadzić do zaburzeń o charakterze neurologicznym wynikających z peroksydacji błon komórkowych neuronów oraz procesów neurodegeneracyjnych zachodzących w mózgu, których nasilenie obserwowane jest wraz z wiekiem (78). Z kolei obecność tokoferoli i tokotrienoli, pod postacią witaminy E, ze względu na silny potencjał antyoksydacyjny opóźnia procesy starzenia. Pełnią rolę biologicznych antyoksydantów, które inaktywują wolne rodniki i hamują rozwój nadtlenkowego utlenienia nienasyconych lipidów (22, 76). U osób dorosłych deficyt witaminy E wynika najczęściej z zaburzenia wchłaniania tokoferoli jaki obserwuje się np. w przypadku usunięcia części jelita cienkiego lub w przypadku biegunki tłuszczowej. Niedobór jest przyczyną wzrostu ryzyka występowania chorób układu krążenia, infekcji czy też procesów zapalnych (76). Szczególnie niebezpieczny jest niedobór witaminy E u dzieci, który może prowadzić do zaburzeń wzroku (retinopatii) czy niedokrwistości (79). Należy pamiętać, iż witamina E nie jest syntetyzowana w organizmie, a więc wszelkie niedobory mają podłoże żywieniowe. Objawy niedoboru pojawiają się przy stężeniu tokoferoli poniżej 0,5 mg/dl (78).

W roku 2017 odbyło się pierwsze międzynarodowe sympozjum "The beneficial effects of argan oil on human health" podczas którego w 32 wystąpieniach i 66 posterach zaprezentowano wyniki badań oleju arganowego naukowców z Maroko, Tunezji, Hiszpanii, Francji i USA (80). Potwierdzono, że olej arganowy, poprzez swój skład, wykazuje właściwości przydatne w leczeniu schorzeń sercowo-naczyniowych, miażdżycy, nadciśnienia, stanów zapalnych oraz w profilaktyce chorób nowotworowych ze względu na swoją aktywność antyoksydacyjną, antyproliferacyjną i cytotoksyczną. Pierwsze badania u ludzi dotyczące korzystnego wpływu oleju arganowego na profil lipidowy i status antyoksydacyjny przeprowadzono w roku 2004 na grupie 96 osób obu płci potwierdzając jego właściwości (26).

3. Stres oksydacyjny.

Termin stres oksydacyjny opisuje poważną dysproporcję pomiędzy ilością wolnych rodników, a działaniem antyoksydantów. Uszkodzenia oksydacyjne powstają nie tylko w warunkach stresu oksydacyjnego, lecz także w wyniku upośledzenia mechanizmów kompensacyjnych i naprawczych. Stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w przebiegu wielu chorób, między innymi w nadciśnieniu płucnym, cukrzycy, przewlekłej niewydolności nerek czy nadciśnieniu tętniczym (81). Przewlekły stres oksydacyjny pełni istotną rolę w patomechanizmie otyłości, a finalnie może prowadzić do schorzeń układu krążenia oraz cukrzycy (82). W konsekwencji działania wolnych rodników mogą zostać uszkodzone narządy takie jak nerki, serce, płuca czy trzustka. Skutkiem działania stresu oksydacyjnego jest aktywacja licznych szlaków wewnątrzkomórkowych, które wywołują apoptozę lub rozrost komórek, przez co dochodzi do zmian w obrębie narządów. Dlatego zwalczanie stresu oksydacyjnego może istotnie wpłynąć na stan narządów wewnętrznych, natomiast oznaczanie niektórych czynników stresu oksydacyjnego może być wykorzystywane jako biomarker w wybranych jednostkach chorobowych (83).

Zaburzenia równowagi pomiędzy wolnymi rodnikami a czynnikami utleniającymi skutkuje uszkodzeniem lipidów, białek oraz DNA. Utlenione cząsteczki białek i lipidów mogą wywoływać cytotoksyczność i prowadzić do uszkodzenia błony komórkowej, zaburzeń w obrębie funkcji enzymów komórkowych czy dysfunkcji kaskady sygnalizacyjnej w komórce (81). Opisane zmiany prowadzą do wystąpienia nie tylko procesów chorobowych, lecz także reakcji zapalnych. Natomiast w konsekwencji uszkodzenia DNA i kwasów nukleinowych komórki dochodzi do jej śmierci (84, 85).

Fizjologicznie w komórkach występują niskie stężenia wolnych rodników oraz reaktywnych form tlenu, które są niezbędne do utrzymania prawidłowego stanu redox, zachowania funkcji tkanek oraz utrzymania procesów sygnalizacyjnych wewnątrz komórki (86).

Do wolnych rodników można zaliczyć reaktywne formy tlenu (ang. Reactive oxygen species – ROS), które są cząsteczkami chemicznymi zawierającymi tlen oraz niesparowany elektron, na przykład anion ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy (HO^\cdot) i rodniki lipidowe (87). Wyjątkiem jest nadtlenek wodoru, który nie posiada wolnego elektronu i nie jest wolnym rodnikiem, ale w reakcji Fentona reaguje z jonami żelaza Fe^{3+} tworząc bardzo reaktywne chemicznie rodniki hydroksylowe. Nadtlenek wodoru może zostać zredukowany do H_2O i O_2 przez peroksydazę glutationową lub katalazę (87). Reaktywne formy tlenu są nieustannie produkowane przez mitochondria, peroksyzomy oraz retikulum endoplazmatyczne. Wśród enzymów biorących udział w produkcji wolnych rodników można wyróżnić cyklooksygenazę, lipooksygenazę, syntazę NO, osygenazę hemową, peroksygenazę, oksydazę NADH/NADPH, białko hemowe oraz oksydazę ksantynową (81). Reaktywne formy tlenu prowadzą do uszkodzenia narządów i tkanek na skutek oddziaływania wielu mechanizmów, włącznie z proliferacją lub przerostem komórek oraz ich apoptozą. Niemniej jednak mechanizm wywołujący apoptozę lub rozrost komórek nie został nadal w pełni poznany (88). Na skutek działania reaktywnych form tlenu dochodzi do uszkodzenia lipidów, białek, DNA i upośledzenia funkcji komórek (86). Reaktywne formy tlenu uczestniczą w przebiegu otyłości i chorób z nią związanych – miażdżycy, cukrzycy typu 2 czy zapaleniu stawów (89-92).

4. Fizjologia tkanki kostnej.

Tkanka kostna jest wyspecjalizowaną strukturą pochodzenia mezenchymalnego, aktywną metabolicznie. Pełni funkcję podporowo-nośną warunkując utrzymanie postawy ciała oraz zapewnia prawidłowość czynności lokomotorycznych. Jest elementem ochronnym dla innych tkanek i narządów oraz pełni funkcję metaboliczną jako rezerwuar związków mineralnych, głównie wapnia i fosforu. W warunkach fizjologicznych funkcja metaboliczna zapewniona jest

przez specyficzną architekturę tkanki kostnej oraz obecność komórek kostnych tj. osteoblastów, osteocytów i osteoklastów (93-95). Nie dochodzi też wtedy do osłabienia wytrzymałości mechanicznej kośćca. W warunkach patologicznych utrzymanie homeostazy mineralnej ustroju może odbywać się kosztem odporności mechanicznej co wiąże się z osłabieniem wytrzymałości szkieletu na działanie sił obciążających i zwiększoną skłonnością do złamań (93, 96).

Podczas całego życia osobniczego tkanka kostna podlega stałemu modelowaniu strukturalnemu oraz przebudowie, które związane są z procesami kościotworzenia i resorpcji. Modelowanie strukturalne (ang. bone modelling) jest procesem, w którym osteogeneza przeważa nad resorpcją (97). Prowadzi to do wzrostu kości na długość i grubość oraz zwiększa ich masę. Modelowanie strukturalne warunkuje osiągnięcie przez kość odpowiednich rozmiarów i kształtów anatomicznych oraz prawidłowej budowy wewnętrznej zdolnej do przeciwdziałania sile grawitacji oraz naprężeniom mechanicznym jakie powstają podczas pełnienia funkcji podporowych i lokomocyjnych (98). Modelowanie strukturalne rozpoczyna się w momencie tworzenia się kości u płodu i trwa do momentu zakończenia wzrostu szkieletu. Proces ten może również występować u osób dorosłych jako odpowiedź tkanki kostnej na zwiększone obciążenia. Oprócz modelowania w tkance kostnej zachodzi również proces przebudowy wewnętrznej (ang. bone remodeling) (97). Odbywa się on podczas całego życia organizmu i ma charakter cykliczny (93, 94). W trakcie przebudowy naprzemiennie zachodzą procesy resorpcji i kościotworzenia. Ma to na celu utrzymanie odpowiedniej ilości i jakości tkanki kostnej w okresie całego życia. Przyjmuje się, że w wyniku przebudowy wewnętrznej cały szkielet ulega kilkakrotnej wymianie w ciągu życia (średnio co 10 lat) (99). Remodeling przebiega w ściśle określonych miejscach tzw. miejscach aktywnej przebudowy (ang. bone remodeling unit – BRU). Oprócz komórek tkanki kostnej w BRU obecne są również komórki towarzyszące pochodzenia szpikowego takie jak komórki limfoidalne, makrofagi, monocyty, komórki tuczne (93). Z tego też względu miejsca te określa się również jako

wielokomórkowe jednostki przebudowy kości (ang. bone multicellular unit – BMU). Przewaga procesów kościotworzenia nad procesami resorpcji powoduje, że między 20 a 30 rokiem życia osiągnięta jest szczytowa masa kostna (ang. peak bone mass – PBM), która po osiągnięciu swojego maksimum utrzymuje się przez pewien czas na stałym poziomie dzięki równowadze między resorpcją a kościotworzeniem, po czym następuje okres inwolucji, czyli powolnego zmniejszania się gęstości mineralnej tkanki kostnej (ang. bone mineral density – BMD), który w przypadku kobiet po menopauzie ocenia się na około 1,2 – 2% rocznie (100). Przyjmuje się, że w 75-80% szczytowa masa kostna jest uwarunkowana genetycznie, pozostała część natomiast wiąże się z aktywnością fizyczną, sposobem odżywiania (w tym zawartością wapnia w diecie), rasą (wyższa obserwowana jest u rasy czarnej niż u żółtej i białej), czasem rozpoczęcia dojrzewania płciowego czy polimorfizmem genu dla receptora witaminy D3 (101). Wielkość szczytowej masy kostnej jest zależna od płci, u mężczyzn jest ona około 8-10% wyższa niż u kobiet, co przekłada się między innymi na większą odporność mechaniczną kości (101).

U kobiet, okres okołomenopauzalny, który obejmuje kilka lat poprzedzających menopauzę oraz co najmniej 12 miesięcy po menopauzie, wiąże się z ustaniem ochronnego działania estrogenów na tkankę kostną, polegającego na stymulowaniu osteogenezy i hamowaniu procesu resorpcji kości (102). Efektem tego jest nasilona utrata masy kostnej i występowanie osteoporozy pierwotnej (inwolucyjnej), której cechą charakterystyczną jest stopniowy zanik warstwy beleczkowej kości w stosunku do warstwy zbitej, a zmniejszenie masy kostnej wynika z nadmiernej aktywności komórek kościogubnych (102).

Jak już wspomniano wcześniej przebudowa tkanki kostnej wymaga ciągłości procesów formowania i resorpcji. Równowaga między nimi jest kluczowa dla utrzymania prawidłowej struktury kości, zachowania funkcji podporowej, ochronnej i metabolicznej. Z kolei utrzymanie

tej równowagi opiera się na czynnościowej zależności pomiędzy komórkami kostnymi tj. między osteoblastami a osteoklastami (93, 95, 96).

W warunkach fizjologicznych głównym mechanizmem kontrolującym te procesy jest szlak RANKL/RANK/OPG. Elementami tego szlaku są: receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (RANK - ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B), jego ligand (RANKL – ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B Ligand) oraz osteoprotegryna (OPG – ang. Osteoprotegrin). RANK jest receptorem aktywującym czynnik jądrowy NF- κ B, występuje w błonie komórkowej osteoklastów i ich prekursorów (93, 103). Jego aktywacja, poprzez znajdujący się w błonie komórkowej osteoblasta RANKL, stymuluje osteoklastogenezę oraz aktywność dojrzałego osteoklasta (resorpcję). Obecność RANK wykazują także komórki linii monocytarno-makrofagowej, limfocyty T i B, proteosteoklasty i dojrzałe osteoklasty, komórki dendrytyczne, fibroblasty, chondrocyty i komórki śródbłonna naczyniowego (104). Obecność RANK stwierdzono również w następujących tkankach: mięśniach szkieletowych, skórze, nerkach, wątrobie, płucach, mózgu, szpiku kostnym i kościach (105-107). Czynniki zwiększającymi ekspresję RANK są między innymi: witamina D3, IL-1, OSM, VIP, MIP-1 α . Do czynników zmniejszających ekspresję zaliczamy: IGF-1, IL-4, FGF2 (108-110). RANKL należy do białek z rodziny czynników martwicy nowotworów (ang. Tumor Necrosis Factor - TNF). Na poziom ekspresji RANKL mają wpływ cytokiny (IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α), glikokortykosteroidy, komórki podścieliska, osteoblasty, komórki mezenchymalne okostnej, chondrocyty i komórki śródbłonna (111). U człowieka oraz myszy odkryto 3 izoformy RANKL. RANKL1 i RANKL2 są glikoproteinami typu II związanymi z błoną komórkową, RANKL3 natomiast jest pierwotną formą rozpuszczalną RANKL (sRANKL – ang. soluble RANKL) (110, 112, 113). RANKL 1 i 2 występują między innymi w aktywowanych limfocytach T, niedojrzałych limfocytach B, osteoblastach, osteoklastach, fibroblastach, komórkach śródbłonna naczyniowego. Synteza pierwotnej postaci sRANKL występuje jedynie w

aktywowanych limfocytach T i niektórych liniach komórek nowotworowych (110, 114). Przyjmuje się, że forma związana z błoną komórkową jest bardziej aktywna w procesie osteoklastogenezy (115). RANKL przy udziale M-CSF (ang. Macrophage Colony-Stimulating Factor) indukuje osteoklastogenezę, a poprzez wiązanie się z RANK, który jest obecny na komórkach progenitorowych osteoklastów oraz na dojrzałych osteoklastach, hamuje ich apoptozę (104). Układ RANKL/RANK oprócz procesów związanych z kostnieniem uczestniczy także w funkcji komórek śródbłonna naczyń krwionośnych pomagając w utrzymaniu jego integralności. Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych uwalniają RANKL, który stymuluje ekspresję RANK w komórkach śródbłonna, co wspólnie z czynnikami wzrostowymi (bFGF, angiopoetyna 1) chroni je przed apoptozą (110, 116).

Osteoprotegryna (OPG), podobnie jak RANKL, należy do białek z rodziny TNF. Jest syntetyzowana przede wszystkim przez osteoblasty oraz m.in. płuca, wątrobę, żołądek, nerki, skórę, śledzionę, tarczycę, węzły chłonne. Syntezę OPG wykazano również w komórkach śródbłonna, komórkach zrębu szpiku, komórkach dendrytycznych, limfocytach T i B, fibroblastach i komórkach mięśniówki gładkiej aorty. Osteoprotegryna jest receptorem kompetycyjnym (ang. Decoy Receptor) dla RANKL będąc dla niego swoistym receptorem-pułapką. Łącząc się z RANKL blokuje połączenie z RANK przez co zapobiega jego aktywacji na powierzchni osteoklastów uniemożliwiając resorpcję kości poprzez modulację syntezy osteoklastów. W warunkach fizjologicznych stosunek RANKL/OPG jest stały. W przypadku przewagi RANKL nad OPG poziom resorpcji kości jest patologicznie podwyższony, natomiast w przypadku przewagi OPG nad RANKL intensywność procesów resorpcji jest patologicznie obniżona (117). Jak wykazały badania Siminet i wsp. (118) oraz Bucay i wsp. (119) u transgenicznych myszy z nadmierną ekspresją OPG stwierdzono osteopetrozę (zwiększenie BMD) i upośledzenie dojrzewania osteoklastów. Z kolei

u myszy pozbawionych OPG rozwijała się nasilona osteoporoza ze skłonnością do złamań wskutek zwiększenia puli osteoklastów.

Większość klasycznych hormonów, o znanym wpływie na tkankę kostną (hormony płciowe, parathormon, tyreotropina, glikokortykoidy), wywiera swój wpływ na osteoblasty i osteoklasty za pośrednictwem szlaku RANKL/RANK/OPG (95).

Na poziomie komórki układ RANKL/RANK/OPG aktywuje szlak Wnt/ β -katenina jedną z dróg wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się roli szlaku Wnt/ β -katenina oraz białek należących do grupy lipoproteinowych białek receptorowych (LRP - ang. lipoprotein receptor-related proteins) w etiologii osteoporozy (120-123). W procesach metabolizmu kostnego aktywacja szlaku Wnt powoduje stymulację procesów kościotworzenia poprzez pobudzanie różnicowania osteoblastów i hamuje resorpcję kości poprzez blokowanie aktywatorów układu RANK/RANKL (103, 120).

Szlak Wnt może przebiegać z aktywacją ścieżki klasycznej (kanonicznej, zależnej od β -kateniny) lub na drodze kilku ścieżek nieklasycznych (niezależnych od β -kateniny) (124, 125). Białka Wnt działają na komórkę docelową przez połączenie ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej – typu Frizzled oraz koreceptorami z rodziny LRP (ang. low density lipoprotein co-receptor) LRP5 i LRP6 tworząc trimeryczny kompleks uruchamiający kaskadę transdukcji sygnału z błony komórkowej do jądra komórki docelowej, gdzie dochodzi do pobudzenia ekspresji odpowiednich genów (klasyczna ścieżka Wnt) (126, 127). Powoduje to zwiększenie zaangażowania i różnicowania komórek macierzystych szpiku kostnego w kierunku stymulacji linii osteoblastów, jednocześnie zmniejszając stymulację w kierunku linii chondrogennych czy adipogennych (105, 123). Aktywacja szlaku Wnt/ β -katenina zapobiega także apoptozie dojrzałych osteoblastów i tym samym przedłuża ich żywotność (123). Dodatkowo szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina zmniejsza różnicowanie osteoklastów poprzez

stymulację syntezy oraz wydzielania osteoprotegeryny, której zasadniczą funkcją jest regulacja resorpcji kości poprzez zahamowanie różnicowania osteoklastów w formy dojrzałe (128, 129). Kanoniczny szlak sygnałowy Wnt w osteoblastach odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu powstawania kości, a zaburzenia jego aktywności są przyczyną zakłóceń metabolizmu tkanki kostnej (103). Rolę regulatorów szlaku Wnt/ β -katenina pełnią antagoniści szlaku, do których zalicza się sklerostynę, białka Dkk1 i Dkk2 (ang. Dickkopf related protein-1, -2) oraz białka Wise (123, 130). Po przyłączeniu się do receptorów LRP5/LRP6 blokują ich dostępność dla białek Wnt, „wyłączają” klasyczną ścieżkę sygnalizacyjną i prowadzą do zahamowania osteoblastogenezy indukowanej szlakiem Wnt/ β -katenina (122, 131).

Tkanka kostna mimo swojej pozornej twardości jest tkanką plastyczną, która może zmieniać swoje kształty pod wpływem siły nacisku i naprężenia. Osteocyty są komórkami, które wykazują się zdolnością reagowania na oddziaływanie sił mechanicznych (nacisk) za pośrednictwem płynu okołokomórkowego jamek i kanalików. Ciśnienie hydrostatyczne płynu zmienia się proporcjonalnie do obciążenia kości. Osteocyty reagując na obciążenia mechaniczne (za pośrednictwem zmian ciśnienia) wysyłają „sygnały”, które aktywują procesy resorpcji tkanki kostnej (za pośrednictwem osteoklastów i samych osteocytów) lub aktywują procesy osteogenezy za pośrednictwem osteoblastów. Jako sygnały wykorzystywane są prostaglandyny, tlenek azotu, IGF oraz sklerostyna (132). Tlenek azotu i IGF są regulatorami anabolizmu tkanki kostnej, zaś sklerostyna jest silnym inhibitorem osteoblastów ze względu na hamowanie ścieżki sygnałowej Wnt stanowiącej główny szlak ich aktywacji. Osteocyty nie poddane działaniu sił obciążających zwiększają ekspresję genu SOST odpowiedzialnego za produkcję sklerostyny oraz ligandu dla receptora RANK. Receptory te, znajdujące się na powierzchni komórek linii osteoklastycznej uaktywnione po

przyłączeniu liganda RANKL, pobudzają osteoklastogenezę i funkcję resorpcyjną osteoklastów (132-134). Osteocyty nie są jedynie komórkami mechanoreceptorowymi ale pełnią również istotną rolę w procesie przebudowy kości i regulacji gospodarki fosforanowej (135).

Na procesy przebudowy tkanki kostnej oprócz opisanych mechanizmów mogą wpływać również inne czynniki w tym hormony, wiek organizmu, stan zapalny i stres oksydacyjny. W szczególności stres oksydacyjny działa niekorzystne na różne rodzaje komórek kostnych zaangażowanych w przebudowę kości. Ostatnie badania dowodzą, że stres oksydacyjny może wpływać na różnicowanie i proliferację osteoklastów (123, 136, 137), prowadząc do zaburzenia równowagi między funkcjami osteoklastów a osteoblastów, co skutkuje chorobami metabolicznymi kości i zaburzeniami szkieletu, takimi jak osteoliza i osteoporoza (123, 138). Oprócz tego osteoklasty mają wspólnych prekursorów (komórki progenitorowe) z komórkami układu odpornościowego dlatego mogą one bezpośrednio produkować ROS, które wzmagają stres oksydacyjny prowadzący do resorpcji kości (139).

Równowaga redox jest utrzymywana przez endogenne szlaki antyoksydacyjne, w tym szlak Keap1-Nrf2-ARE (ang. Kelch-like ECH-associated protein 1 - Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 - Antioxidant Response Element) który jest kluczowym szlakiem przeciwdziałającym stresowi oksydacyjnemu i stanom zapalnym w organizmie. Jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf2) stanowi jeden z kluczowych elementów odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny, a jego aktywacja modyfikuje ekspresję genów będących elementami odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) (22, 140, 141). Jako „molekularny strażnik” chroni komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, a regulacja następuje poprzez aktywację transkrypcji cytoprotekcyjnych enzymów fazy II, takich jak oksygenaza hemowa 1 (HO-1),

dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), S-transferaza glutationowa (GST) czy ligaza γ -glutamylcysteiny (GCL) (142).

W odpowiedzi na stres oksydacyjny, Nrf2 zostaje aktywowany i pobudza odpowiedź antyoksydacyjną w celu zmniejszenia poziomu wewnątrzkomórkowych ROS. W przypadku zmian lub hamowania szlaku Nrf2, poziomy ROS wzrastają, co stymuluje różnicowanie i proliferację osteoklastów (143, 144). Z kolei zwiększone poziomy ROS i związany z nimi stres oksydacyjny hamują różnicowanie osteoblastów i indukują apoptozę osteocytów oraz osteoblastów zmniejszając tym samym odkładanie macierzy kostnej i przesuwając równowagę w kierunku utraty kości (145, 146).

Stres oksydacyjny może również zaburzać szlak RANK/RANKL/OPG. W szczególności stres oksydacyjny indukuje „regulację w górę” (upregulation) RANKL i „regulację w dół” (downregulation) OPG poprzez aktywację kinaz białkowych, takich jak ERK1/2 (ang. extracellular signaling-regulated kinase) i JNK (ang. c-Jun N-terminal kinase). Dochodzi do blokowania osteoprotegryny i przesunięcia równowagi w kierunku działania resorpcyjnego RANKL co skutkuje zwiększeniem stosunku RANKL/OPG, który jest uważany za ważny czynnik determinujący masę kostną oraz wskaźnik resorpcji kości (147).

Jak już wspomniano wcześniej wszystkie niefizjologiczne zmiany w procesie remodelingu tkanki kostnej skutkują zaburzeniami w jej strukturze. Wiąże się to z osłabieniem jednej z podstawowych funkcji układu kostnego jaką jest funkcja motoryczna. Upośledzenie mikroarchitektury kości wiąże się również z jej zwiększoną podatnością na urazy w tym na złamania, a spowodowane jest to zmniejszoną wytrzymałością mechaniczną na działanie sił obciążających. Stan taki obserwujemy w osteoporozie – jednej z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych.

5. Osteoporoza.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) od 1993 roku definiuje osteoporozę, jako chorobę układową szkieletu, która cechuje się niską masą kostną, zaburzeniami w budowie mikroarchitektury tkanki kostnej oraz zwiększoną łamliwością kości (148). W roku 2001 National Osteoporosis Foundation (NOF) oraz National Institutes of Health (NIH) stworzyły definicję osteoporozy, według której jest to schorzenie charakteryzujące się zwiększonym ryzykiem złamań kości na skutek spadku ich odporności mechanicznej, która jest uzależniona od gęstości mineralnej kości i jakości właściwej tkanki kostnej (149). Na pojawienie się osteoporozy wpływa wiele czynników, między innymi predyspozycja osobnicza, zaburzenia endokrynologiczne, choroby współistniejące i przyjmowane leki oraz czynniki środowiskowe. W przebiegu tej choroby dochodzi do przewagi procesów resorpcji kości na jej tworzeniem. Obserwuje się wtedy zaburzenia typu ilościowego: masy, gęstości mineralnej, wielkości; zaburzenia typu jakościowego: makroarchitektury- geometrii, mikroarchitektury – utkania beleczkowego, metabolicznego obrotu kostnego, mineralizacji, mikrouszkodzeń i usieciowania włókien kolagenowych. Całość tych procesów w konsekwencji prowadzi do powstania zjawiska tzw. rzeszotowienia kości, czyli ścieńczenia i zanikania tkanki kostnej, rozrywania beleczek kostnych w kości gąbczastej i zwiększania się porowatości kości zbitej (150).

Do niedawna schorzenia metaboliczne układu kostnego jakim jest osteoporoza postrzegano głównie jako problem związany z kobietami w wieku menopauzalnym oraz problem chorych przyjmujących glikokortykoidy z powodu chorób np. układu oddechowego. Zakładano, że czynniki ryzyka oraz etiologia procesów osteoporotycznych jakie występują u mężczyzn odpowiadają tym jakie są obserwowane u kobiet, istniejące zaś różnice miały wynikać z braku szybkiej fazy utraty masy kostnej, która stwierdzana jest u kobiet po menopauzie (151).

Wyniki badań wskazują jednakże na istnienie u mężczyzn różnic dotyczących epidemiologii, lokalizacji złamań oraz budowy samej tkanki kostnej i procesów patofizjologicznych w niej zachodzących (152). Mniejsza częstotliwość występowania osteoporozy u mężczyzn związana jest z faktem, iż szczytowa gęstość mineralna kości (BMD) u mężczyzn jest o około 8 do 10% wyższa niż kobiet. Wpływa to więc na wyższą u mężczyzn szczytową masę kostną. Męski układ szkieletowy charakteryzuje się także większymi rozmiarami samych kości, a co za tym idzie obciążenia mechaniczne jakie są generowane podczas aktywności fizycznej rozkładane są na większy obszar przekroju poprzecznego kości. Zwiększony rozmiar układu kostnego jest pochodną działania androgenów, które już od początku okresu dojrzewania wpływają na okostną u mężczyzn (151). Wraz z wiekiem, bardziej u mężczyzn niż u kobiet, wzrasta też zewnętrzna średnica kości. Inaczej wygląda również zachowanie się mikrostruktury beleczek kostnych w zależności od płci. U mężczyzn jest ona silniej rozbudowana i bardziej zagęszczona niż u kobiet, a w miarę starzenia u mężczyzn dochodzi do przerzedzenia się beleczek kostnych, lecz nie ich utraty. U kobiet natomiast starzenie jest bardziej związane z perforacją beleczek i utratą połączeń między nimi, co jest charakterystyczne dla zjawiska przyspieszonej resorpcji kości na podłożu menopauzalnym (153, 154). Proces menopauzy u kobiet charakteryzuje się dość gwałtownym spadkiem estrogenów w przeciwieństwie do mężczyzn, u których spadek poziomu androgenów ma wolniejszy charakter i zachodzi stopniowo. Przyspieszenie tego procesu z reguły obserwuje się w starszym wieku, około 70 roku życia. Należy także pamiętać, że bardzo istotnym czynnikiem mającym wpływ na jakość układu kostnego jest oddziaływanie sił mechanicznych. Tryb życia mężczyzn związany jest generalnie z większą aktywnością fizyczną w przeciwieństwie do kobiet, co warunkuje lepszą jakość mechaniczną kości. Aktywność fizyczna jest również czynnikiem zmniejszającym ryzyko złamań patologicznych, co ma związek ze zmniejszeniem tendencji do upadków z wysokości (1).

Osteoporoza u mężczyzn, podobnie jak u kobiet, charakteryzuje się niską masą kostną, nieprawidłową mikroarchitekturą tkanki kostnej i związaną z tym większą podatnością na urazy i złamania. W przebiegu osteoporozy obserwuje się zarówno jej postać pierwotną (inwolucyjną typu I - pomenopauzalną, inwolucyjną typu II - starczą), jak i wtórną - związaną z innymi schorzeniami i/lub stosowanymi przewlekłe lekami. Za najczęstszą przyczynę postaci pierwotnej uważa się hipogonadyzm wynikający z wieku pacjenta (151). Rzadko obserwuje się osteoporozę pierwotną idiopatyczną, która może wystąpić w każdym wieku (także u dzieci), aczkolwiek w tym przypadku nie jest znana jej bezpośrednia przyczyna (149).

Postać wtórna osteoporozy, na którą przypada od 30 do 60% przypadków związana jest najczęściej z zaburzeniami hormonalnymi takimi jak: hipogonadyzm, nadczynność tarczycy czy cukrzyca (150). Z innych czynników należy wymienić choroby zapalne stawów, choroby przewodu pokarmowego i nerek. Udowodniony wpływ na powstawanie osteoporozy wtórnej mają także niektóre leki. Najczęściej obserwowaną formą jest osteoporoza rozwijająca się, jako efekt stosowania glikokortykosteroidów. Ich działanie polega na hamowaniu różnicowania i dojrzewania osteoblastów i pobudzaniu ich apoptozy. Zmniejsza się również synteza kolagenu typu I i innych białek niekolagenowych. Poprzez wpływ na układ osteoprotegryna/RANK/RANKL dochodzi do zwiększenia resorpcji tkanki kostnej. Zmniejsza się wydzielanie kalcytoniny przez tarczycę i nasila się osteoklastogeneza (150). W utrzymaniu homeostazy tkanki kostnej u mężczyzn istotną rolę pełnią androgeny, jednakże ich niedobór w wieku dojrzałym, oprócz procesów starzenia się, może również wynikać z hiperprolaktynemii, operacji orchidektomii lub stosowania analogów/antagonistów gonadoliberyny (GnRH) w leczeniu raka prostaty. Mechanizm działania analogów polega na aktywacji receptorów dla GnRH w przysadce mózgowej. Efektem tego jest początkowa jej hiperstymulacja i wzrost stężenia testosteronu w krwi. Następnie po około 2-3 tygodniach dochodzi do wyczerpania wrażliwości receptorów dla

GnRH, aktywność hormonalna przysadki zmniejsza się powodując spadek stężenia testosteronu. Z kolei mechanizm działania antagonistów polega na hamowaniu aktywności przysadki poprzez blokowanie receptorów dla GnRH. W tym przypadku nie obserwuje się początkowego przemijającego wzrostu stężenia testosteronu w surowicy krwi (155).

Z kolei choroby układu pokarmowego takie jak choroba Leśniowskiego-Crona, wrzodziejące zapalenie jelita grubego czy też stany po resekcji żołądka lub jelit również są czynnikami mającymi wpływ na rozwój osteoporozy poprzez zaburzenie wchłaniania wapnia i witaminy D3 z jelit (156). Do innych czynników proosteoporotycznych należą hiperkalciuria spowodowana zwiększonym wchłanianiem wapnia w jelitach (absorpcyjna), nadmiernym wydalaniem wapnia z moczem (nerkowa) lub nadmiarem wapnia pochodzącym z kości (resorpcyjna) najczęściej spotykana w nadczynności przytarczyc (157).

Poziom estrogenów odgrywa również dużą rolę w kondycji szkieletu u mężczyzn. W przypadku prawidłowego poziomu estrogenów szczytowa masa kostna jest prawidłowa (150). Przeciwnie, jeżeli dochodzi do spadku ich poziomu obserwuje się zwiększoną przebudowę kości oraz utratę masy kostnej (158, 159). Jak wykazały badania wielośrodkowe obniżony poziom estradiolu w surowicy jest ważnym czynnikiem ryzyka złamań kostnych u mężczyzn w wieku 65 lat i starszych, a połączenie niskiego poziomu estradiolu i wolnego testosteronu zwiększa ryzyko utraty masy kostnej i prowadzi do złamań (160, 161). Innym czynnikiem mającym wpływ na jakość układu kostnego jest poziom dehydroepiandrosteronu (DHEA) i jego siarczanu (DHEAS), które produkowane są przez korę nadnerczy. Uważa się, że obie te formy są prekursorem około 50% androgenów u mężczyzn i 75% estrogenów u kobiet przed menopauzą (100% u kobiet po menopauzie) (162). Zmniejszony poziom DHEA skutkuje obniżeniem BMD, osłabieniem mięśni i zwiększonym ryzykiem upadków oraz większym ryzykiem złamań u starszych mężczyzn (163). Jak wykazały badania Villareal i wsp. (2000) suplementacja DHEA w dawce 50 mg dziennie częściowo

odwróciła niekorzystne zmiany w gęstości mineralnej kości kobiet i mężczyzn z niskim stężeniem dehydroepiandrosteronu (164).

Oprócz wpływów hormonalnych istnieją również czynniki związane z wiekiem. Zaliczamy tutaj między innymi cytokiny prozapalne, które u osób starszych mogą prowadzić do wzrostu aktywności osteoklastów i hamowania osteoblastów oraz niedobory witaminy D (163).

Masa mineralna kości jest jednym z podstawowych czynników warunkujących jakość szkieletu oraz jego odporność na urazy i przeciążenia wynikające z codziennej aktywności życiowej. Zależy ona od szeregu czynników, które możemy modyfikować (dieta, aktywność fizyczna) lub też od takich, na które nie mamy wpływu (płeć, wiek). Czynniki żywieniowe są jednymi z najłatwiej modyfikowalnych. Możemy je podzielić na te, które mają swój udział w zachowaniu i zwiększaniu masy kostnej: zachowanie właściwych proporcje między wapniem i fosforem, odpowiednie spożycie wapnia, witaminy D, białka, magnezu, potasu witaminy C i K oraz obecność w diecie kwasów tłuszczowych omega-3 i izoflawonoidów (1, 165). Drugą grupę stanowią natomiast czynniki, których działanie wiąże się z obniżeniem masy kostnej. Zaliczamy tutaj nadmiar w diecie białka, sodu, witaminy A, kofeiny czy alkoholu (166). Zgodnie z zaleceniami The North American Menopause Society (2021) właśnie na te czynniki należy zwrócić szczególną uwagę w działaniach prewencyjnych przed wystąpieniem osteoporozy, zanim zaczniemy stosować terapię farmakologiczną (167). Największe przyrosty masy kostnej przypadają na okres między 11-14 rokiem życia u dziewcząt i 13-17 rokiem życia u chłopców. Fizjologicznie szczytowa masa kostna (osobnicza) jest osiągnięta około trzeciej dekady życia, a następnie obserwujemy jej stopniowy ubytek, który przy znacznym jego stopniu prowadzi do osteoporozy. Należy jednak pamiętać, iż zapewnienie optymalnych warunków przebudowy masy kostnej w pierwszej i drugiej dekadzie życia, a co za tym idzie osiągnięcie jak najwyższej szczytowej masy kostnej będzie miało pozytywne następstwa w starszym wieku. Przyjmuje się, że 2-3% trwały wzrost gęstości

mineralnej tkanki kostnej (BMD) w okresie wzrostu organizmu może obniżyć o około 10-20% ryzyko wystąpienia złamań o podłożu metabolicznym w starszym wieku (168).

6. Złamania osteoporotyczne.

Naturalną konsekwencją obniżonej wytrzymałości mechanicznej szkieletu na działanie sił mechanicznych, związanej z zaburzeniami metabolizmu tkanki kostnej, są złamania. Jednym z najpoważniejszych, ściśle związanym z osteoporozą, jest złamanie szyjki kości udowej, które dotyka zarówno kobiety jak i mężczyzn (151)

Złamania szyjki kości udowej to ogólnoswiatowy problem zdrowotny występujący w całej populacji ludzkiej. Konsekwencją złamań jest utrata niezależności, obniżenie jakości życia oraz zwiększone ryzyko powikłań (169). Należy także pamiętać, że taki rodzaj złamań niesie ze sobą duże ryzyko problemów wynikających z rozległości samego urazu jak i długotrwałego unieruchomienia, które może być przyczyną wystąpienia licznych zdarzeń następnych prowadzących do pogorszenia funkcji narządów jamy brzusznej i klatki piersiowej (upośledzenie wentylacji płuc, nasilenie niewydolności układu krążenia), a przez to jest istotną przyczyną zgonów osób starszych. Z przeprowadzonych badań wynika, że złamanie szyjki kości udowej jest przyczyną śmierci 20% kobiet w ciągu pierwszych 12 miesięcy, 40% kobiet wymaga stałej pomocy przy poruszaniu się, a aż 80% wymaga pomocy innych osób w codziennych czynnościach (170). Okazuje się również, że śmiertelność po tego typu złamaniu jest większa w przypadku mężczyzn i wynosi około 30% (151). Istotnym jest również fakt, iż złamania takie generują także ogromne koszty społeczne i ekonomiczne (171). Według danych uzyskanych przez Williamsona i wsp. (172) w roku 2017 koszty opieki medycznej w USA w ciągu 12 miesięcy po złamaniu szyjki kości udowej wahały się od blisko 22 do ponad 44 tysięcy USD. Średni koszt operacji złamania, w prywatnej klinice w Polsce, to około 12-15 tysięcy zł (bez kosztów znieczulenia i implantów). Najczęstszą

przyczyną złamania jest upadek na staw, a częstość występowania złamań zmienia się wraz z wiekiem. Przed 60 tym rokiem życia złamania szyjki kości udowej są częściej obserwowane u mężczyzn jako tzw. złamania wysokoenergetyczne (np. w wyniku wypadku komunikacyjnego lub upadku z dużej wysokości). Powyżej 60 roku życia ten typ złamań jest częściej obserwowany u kobiet, a głównym czynnikiem go wywołującym są schorzenia metaboliczne układu kostnego takie jak osteomalacja lub osteoporoza. Obserwowany wraz z wiekiem wzrost częstości występowania tego typu złamań jest nie tylko związany ze starzeniem się społeczeństwa, ale również ze zmniejszaniem się gęstości mineralnej kości (BMD), oraz spadkiem aktywności fizycznej (169). Większa podatność na upadki, którą obserwuje się u seniorów jest również pochodną zjawiska określanego mianem niedołążności starczej, kiedy dochodzi do upośledzenia wzroku, słuchu, atrofii mięśni i nasilenia chorób o podłożu neurologicznym. Czasami obserwuje się również złamania samoistne, bez zauważalnego urazu. Sytuacja taka może mieć miejsce, kiedy zmiany chorobowe w obrębie stawu biodrowego lub ogólne zmiany w kośćcu są bardzo zaawansowane. Niestety, w przypadku osób starszych dodatkowo dochodzi kolejny czynnik jakim jest bardzo długi proces gojenia złamania, a w efekcie niemożliwym niekiedy staje się całkowite odzyskanie sprawności narządu ruchu. Konsekwencją tego są zaburzenia chodu i niemożność samodzielnego poruszania się (169).

W badaniach opublikowanych przez Sing i wsp. (173) oceniono trendy pokoleniowe w częstości występowania złamań szyjki kości udowej oraz towarzyszącą temu złamaniu śmiertelność w latach 2005-2018. Zidentyfikowano prawie 4,2 mln przypadków złamań. Proporcje przypadków na 100 tys mieszkańców wahały się od 95,1 (Brazylia) do prawie 316 (Dania). Mimo ogólnej tendencji spadkowej przewiduje się, że całkowita liczba złamań w latach 2018-2050 wzrośnie dwukrotnie. W 18 krajach należących do różnych regionów geograficznych (Oceania, Azja, Północna i Zachodnia Europa, Północna i Południowa Ameryka) stwierdzono

niestety znaczną lukę w leczeniu pacjentów ze złamaniem szyjki kości udowej, u których nie wprowadzono terapii zapobiegającej złamaniom w przyszłości, szczególnie w przypadku mężczyzn. Jak podkreślają autorzy, objęci badaniem mężczyźni rzadziej przyjmowali leki przeciwko osteoporozie, również w tej grupie była większa śmiertelność, a przewidywane do roku 2050 zwiększenie liczby złamań było w ich przypadku również większe (173).

Oprócz osteoporozy czy też braku aktywności fizycznej do czynników predysponujących do wystąpienia złamania szyjki kości udowej zaliczamy również choroby nowotworowe (nowotwory kości), wrodzoną łamliwość kości, przyjmowanie sterydowych leków przeciwzapalnych oraz nieprawidłową dietę (157).

Szeroko rozumiana edukacja oraz profilaktyka osteoporozy obecnie są szczególnie istotne, ponieważ czas przeżycia osobniczego u ludzi ulega wydłużeniu. Jest to najprawdopodobniej spowodowane poprawą jakości odżywiania oraz spadkiem śmiertelności na skutek chorób zakaźnych (174). Starzenie się jest samoistnym i postępującym procesem, w trakcie którego obserwuje się degenerację struktur organizmu (175). Proces ten jest złożonym mechanizmem, w przebiegu którego dochodzi do osłabienia procesów homeostazy i kompensacji występujących obciążeń między innymi biochemicznych oraz fizjologicznych, lecz także psychologicznych czy społecznych (176). Wśród czynników biorących udział w starzeniu można wyróżnić także stres oksydacyjny, co stanowi dodatkowe ryzyko u osób starszych.

Najważniejszym aspektem w terapii osteoporozy jest profilaktyka i edukacja, dlatego tak istotne jest poznanie czynników, mogących zwiększać ryzyko wystąpienia osteoporozy. Część czynników ryzyka pojawienia się zmian osteoporotycznych jest niemożliwa lub bardzo trudna do uniknięcia. Są to stosowane leki, zanieczyszczenie środowiska, zmiany hormonalne w organizmie czy fizjologiczne procesy starzenia organizmu. Jednakże część czynników predysponujących, takich jak niedobory żywieniowe i niewłaściwa dieta, używki lub niedostateczny poziom

aktywności fizycznej, może zostać w pełni wyeliminowana, co może znacząco poprawić kondycję tkanki kostnej w przyszłości (1, 177). Zmiana nawyków żywieniowych, czy modyfikacje w diecie, są relatywnie łatwe do zastosowania, przy czym mogą przynieść wymiennie duże rezultaty (165). Co więcej przemyślana i zasadna suplementacja może okazać się skuteczna nie tylko w kwestiach dietetycznych, lecz także oddziaływać korzystnie wobec innych patomechanizmów powstawania zmian osteoporotycznych. Zmiany żywieniowe, czy wprowadzenie dodatkowych składników dietetycznych, mogą okazać się korzystne nie tylko w tym aspekcie, ale także mogą wykazywać dodatkowe działanie, na przykład antyoksydacyjne (165). Dzięki temu jednocześnie można uzyskać pozytywny efekt na kilku płaszczyznach.

Warto poddać szczegółowej analizie działanie substancji, które wykazują pozytywne rezultaty nie tylko jako składnik żywieniowy, a doskonałym przykładem jest olej arganowy i zawarte w nim substancje. Olej arganowy jest nie tylko wartościowym składnikiem odżywczym, lecz także działa jako przeciwutleniacz, reguluje ciśnienie krwi, korzystnie wpływa na metabolizm lipidów, stabilizuje poziom insuliny w surowicy krwi.

7. Cel pracy

Celem podjętych badań była ocena wpływu stosowania substancji o charakterze antyoksydacyjnym jakim jest olej arganowy na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwoju zmian zanikowych indukowanych obustronną orchidektomią. Jako gatunek modelowy wykorzystano w doświadczeniu szczury szczepy Wistar, które są uznanym obiektem w tego typu badaniach, a uzyskane efekty mogą być traktowane referencyjnie w odniesieniu do ludzi (178).

8. Materiał i metody.

Doświadczenie wykonano na 40 samcach szczurów szczepu Wistar w wieku około 3 miesięcy i początkowej masie ciała 300 ± 30 gramów. Całość doświadczenia przeprowadzono w Ośrodku Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (skąd również pochodziły zwierzęta) po uzyskaniu pozwolenia na badania wydanego przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie (pozwolenie nr. 92/2019). Zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach wiatryjnych (temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, wilgotność $55\% \pm 5\%$, cykl 12/12 godzin dzień/noc). Wszystkie zwierzęta umieszczone w plastikowych klatkach Tecniplast po 2 sztuki/klatkę ze stałym dostępem do wody i paszy bytowej - Altromin Standard 1320 (Altromin, Niemcy) w regałach indywidualnie wentylowanych. Klatki zaopatrzone były w ściótkę oraz elementy wzbogacające środowisko dla gryzoni (rurki tekturowe, materiał gniazdowy).

Przed rozpoczęciem części doświadczalnej zwierzęta poddano 7-dniowemu okresowi adaptacji do warunków laboratoryjnych podczas którego szczury były przyzwyczajane do dotyku i zapachu człowieka (tzw. handling). Zwierzęta wyjmowano codziennie z klatki i głaskano przez kilka minut. Czynność ta pozwoliła na zminimalizowanie stresu zwierząt podczas bardziej inwazyjnych etapów procedury doświadczalnej. Po 7-dniowej aklimatyzacji wykonano zabiegi operacyjne operacji rzekomych oraz orchidektomii poprzedzone 12-godzinną głodówką. Jako narkozę wziewną zastosowano podanie Izofluranu (Geulincx, Polska) (indukcja 4%, podtrzymanie 2,5%). Operacja orchidektomii polegała na przecięciu skóry na worku mosznym, a następnie na usunięciu obu jąder i zespoleniu brzegów ran szwami. Podczas operacji rzekomych, po wprowadzeniu zwierzęcia w stan narkozy, przecinano jedynie skórę na worku mosznym, a następnie ją zszywano (179). Do szycia używano szwów poliamidowych Ethilon 4-0 i 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, USA). Po zabiegu samce umieszczano w oddzielnych klatkach na okres 3 dni.

Postępowanie takie umożliwiło uformowanie stabilnych zrostów przecinanych tkanek, znacząco zmniejszając ryzyko powikłań pooperacyjnych oraz upadków zwierząt. Jako środek przeciwbólowy po zabiegach operacyjnych zastosowano Melovem (Dopharm B.V. Holandia) w dawce 2mg/kg m.c. W celu zapobiegnięcia ewentualnym stanom zapalnym zwierzętom poddanym operacji wprowadzono do rany antybiotyk Betamox (ScanVet, Polska) w dawce 0,5 ml. Bezpośrednio po operacji wszystkie zwierzęta miały zapewniony stały dostęp do wody i paszy. Po 3-dniowym okresie rekonwalescencji szczury podzielono na 5 grup według poniższego schematu (w przypadku zwierząt z grup ORX podział był losowy):

1. **SHO** – grupa (n=8) kontrolna operowana rzekomo - płyn fizjologiczny w dawce 0,5 ml/100 g m.c./24h sondą dożołądkowo.
2. **ORX-PhS** – grupa (n=8) kontrolna orchidektomizowana - płyn fizjologiczny w dawce 0,5 ml/100 g m.c./24h sondą dożołądkowo.
3. **ORX-TEST** - grupa (n=8) kontrolna orchidektomizowana - testosteron s.c. w dawce 7 mg/kg masy ciała/7 dni
4. **ORX-AO50** – grupa (n=8) otrzymująca olej arganowy w dawce 0,5 ml/100 g m.c./24h, sondą dożołądkowo.
5. **ORX-AO150** – grupa (n=8) otrzymująca olej arganowy w dawce 1,5 ml/100 g m.c./24h, sondą dożołądkowo.

Płyn fizjologiczny oraz olej arganowy (Argamis, Maroko, Certyfikat: MA-BIO-154 -Ecocert) podawano dożołądkowo za pomocą plastikowych sond (Instech-Solomon, USA) dostosowanych do masy ciała zwierzęcia, testosteron (Jelfa, Polska) podawano w iniekcji podskórnej. Podania realizowano w godzinach 9-11. Objętości płynu fizjologicznego, oleju oraz dawki testosteronu ustalano na podstawie masy ciała kontrolowanej 2 razy w tygodniu. Okres trwania doświadczenia wynosił 60 dni od momentu rozpoczęcia podawania poszczególnych substancji. Po zakończeniu doświadczenia wszystkie szczury poddano eutanazji poprzedzonej 12-godziną głodówką w celu eliminacji wpływu paszy na parametry biochemiczne krwi. Przed wykonaniem eutanazji zwierzęta

zważono, a następnie uśpiono przez przedawkowanie CO₂. Przez punkcję dokomorową pobrano krew do próbek, a po powstaniu skrzepu odwirowano przez 10 minut przy obrotach 3000/min. Otrzymaną surowicę podzielono na mniejsze objętości i zamrożono do dalszych badań. Bezpośrednio po eutanazji wykonano badanie densytometryczne (ang. Dual-energy X-ray Absorptiometry - DXA) całego szkieletu w celu określenia gęstości mineralnej kości (ang. Bone Mineral Density - BMD) oraz zawartości mineralnej kości (ang. Bone Mineral Content - BMC). Następnie wyizolowano obie kości udowe, które oczyszczono z tkanek miękkich i zamrożono do dalszych badań. Prawą kość udową przeznaczono do analiz DXA, tomograficznych (ang. Peripheral Quantitative Computed Tomography – pQCT) oraz wykonano test wytrzymałościowy szyjki kości. Lewa kość udowa została przeznaczona do wykonania trójpunktowego testu ugięcia poprzedzonego skanem pQCT.

Wszystkie analizy materiału biologicznego uzyskanego w trakcie doświadczenia zostały przeprowadzone przy pomocy aparatury będącej na wyposażeniu Katedry Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie.

8.1. Densytometryczna analiza gęstości mineralnej i zawartości mineralnej całego szkieletu oraz izolowanych kości udowych z uwzględnieniem szyjki i głowy kości udowej.

Analiza gęstości mineralnej (ang. Bone Mineral Density – BMD), zawartości mineralnej (Bone Mineral Content – BMC), powierzchni (Area) całego kośćca oraz izolowanych kości udowych, w tym szyjki i głowy, została przeprowadzona w oparciu o metodę absorpcji podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego (ang. Dual-Energy X-ray Absorptiometry, DXA).

Ocenie poddano następujące parametry:

1. gęstość mineralną całego kośćca – Ts.BMD (g/cm²)
2. zawartość mineralną całego kośćca - Ts.BMC (g)
3. powierzchnię całego kośćca - Ts.Area (cm²)

4. gęstość mineralną kości udowych – F.BMD (g/cm²)
5. zawartość mineralną kości udowych F.BMC (g)
6. powierzchnię kości udowych F.Area (cm²)
7. gęstość mineralną szyjki kości udowych S.BMD (g/cm²)
8. zawartość mineralną szyjki kości udowych S.BMC (g)
9. gęstość mineralną głowy kości udowych G.BMD (g/cm²)
10. zawartość mineralną głowy kości udowych G.BMC (g)

Całość analiz densytometrycznych przeprowadzono przy pomocy densytometru rentgenowskiego Norland Excell Plus (Norland, Fort Atkinson, Wi, USA). Do analizy otrzymanych wyników użyto programu Norland Illuminatus wersja 4.47 z opcją badania kośćca małych zwierząt (ang. Small Animal Scan). Każda analiza została poprzedzona skanem wstępnym (ang. Scout Scan - SS), a po manualnym ustaleniu ROI (ang. Region of Interest) przeprowadzano skan właściwy (pomiarowy) (ang. Measure Scan - MS). Parametry skanów wstępnych oraz skanów właściwych dobrano w zależności od miejsca pomiaru i stosowano je do wszystkich analiz materiału kostnego z całości doświadczenia. Przed każdą serią pomiarową densytometr kalibrowano przy pomocy fantomów dostarczonych przez producenta. Użyto następujących parametrów skanów:

Tabela 2. Parametry skanów densytometrycznych.

Miejsce pomiaru	skan wstępny (SS) prędkość/rozdzielczość	skan właściwy (MS) prędkość/rozdzielczość
całość kośćca	100 mm/s; 3,0 x 3,0 mm	20 mm/s; 3,0 x 3,0 mm
kość udowa	20 mm/s; 1,0 x 1,0 mm	10 mm/s; 0,5 x 0,5 mm
szyjka kości udowej	5 mm/s 0,5 x 0,5 mm	2 mm/s 0,5 x 0,5 mm
głowa kości udowej	5 mm/s 0,5 x 0,5 mm	2 mm/s 0,5 x 0,5 mm

8.2. Tomograficzna analiza izolowanych kości udowych z uwzględnieniem szyjki kości udowej.

Badanie tomograficzne izolowanych kości udowych zostało wykonane za pomocą metody obwodowej ilościowej tomografii komputerowej (ang. Peripheral Quantitative Computed

Tomography – pQCT). Całość analiz tomograficznych przeprowadzono przy użyciu tomografu Stratec XCT Research SA Plus (Stratec Medizintechnik, GmbH, Pforzheim, Niemcy). Do analizy otrzymanych wyników użyto referencyjnego programu Stratec wersja 6.20D. Analiza pQCT pozwala na odrębną i niezależną analizę tkanki kostnej gąbczastej i tkanki kostnej zbitiej. Miejsce analizy określano na podstawie skanu wstępnego przeprowadzonego z prędkością 10 mm/s i ustaleniu linii referencyjnej stanowiącej punkt odniesienia do określenia właściwych miejsc pomiarowych. Linia referencyjna została zlokalizowana prostopadle do osi długiej analizowanej kości oraz stycznie do powierzchni stawu kolanowego kości udowej. Tkanka kostna gąbczasta była analizowana w części przynasadowej dalszej w odległości 5 mm od powierzchni stawu kolanowego. Tkanekę kostną zbitą analizowano w połowie długości kości (50%). Współczynnik progowy dla tkanki kostnej gąbczastej ustalono na poziomie 0,630 cm⁻¹, zaś dla tkanki zbitiej na poziomie 0,790 cm⁻¹. W przypadku szyjki kości udowej analizę przeprowadzono w połowie długości szyjki (180). Po ustaleniu właściwych warunków pomiarowych wykonywano skan właściwy z prędkością 4 mm/min. Przed każdą serią pomiarową tomograf pQCT kalibrowano przy pomocy fantomu hydroksyapatytowego, zgodnie z procedurą producenta.

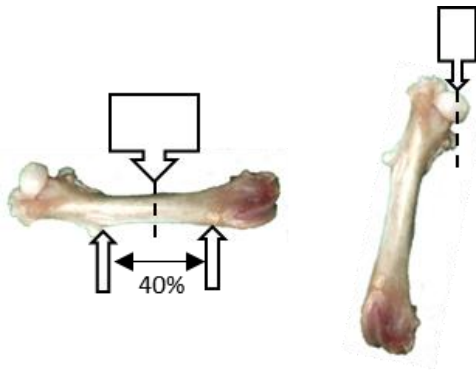
Tabela 3. Parametry tomograficznej oceny tkanki kostnej zbitiej i gąbczastej kości udowych.

Parametry całkowitego przekroju poprzecznego kości oraz tkanki kostnej zbitiej	Parametry całkowitego przekroju poprzecznego kości oraz tkanki kostnej gąbczastej
<ul style="list-style-type: none"> • Całkowita powierzchnia kości (Tot.Ar) • Całkowita zawartość mineralna przekroju kości (Tot.BMC) • Całkowita wolumetryczna przekroju gęstość mineralna przekroju kości (Tot.vBMD) • Grubość tkanki kostnej zbitiej (Ct.Th) • Obwód zewnętrzny kości (Peri.C) • Obwód wewnętrzny kości (Endo.C) • Powierzchnia tkanki kostnej zbitiej (Ct.Ar) • Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitiej (Ct.vBMD) • Zawartość mineralna tkanki kostnej zbitiej (Ct.BMC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Całkowita powierzchnia przekroju kości (Tot.Ar) • Powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej (Tb.Ar) • Całkowita wolumetryczna przekroju gęstość mineralna kości (Tot.vBMD) • Całkowita zawartość mineralna przekroju kości (Tb.BMC) • Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMC) • Zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC)

8.3. Analiza wytrzymałościowa izolowanych kości udowych.

Izolowane kości udowe lewe poddane zostały badaniu wytrzymałościowemu w oparciu o trójpunktowy test ugięcia. Analizę przeprowadzono z użyciem maszyny do badań wytrzymałościowych ZwickRoell Z010 (Zwick GmbH&Co. KG, Ulm, Niemcy) wyposażonego w głowicę pomiarową serii Xforce HP o zakresie nacisku od 0 do 1 kN umieszczając kości na dwóch podporach, których rozstaw (zmienny w zależności od długości kości) odpowiadał 40% jej długości. Za punkt odniesienia przyjęto siłę obciążającą przy stałej prędkości głowicy $v=10$ mm/min. Przed wykonaniem badania kości udowe skanowano przy pomocy metody pQCT co pozwoliło na obliczenie przekroju wewnętrznego (śródkostnego) i zewnętrznego (podokostnowego) trzonu kości w 50% długości tj. w miejscu nacisku głowicy pomiarowej. Taka procedura pozwoliła na zastosowanie testu ugięcia dla próbki o przekroju rury jakim faktycznie jest kość, a nie pręta. Otrzymane dane analizowano przy pomocy programu ZwickRoel testXpert

II (Zwick GmbH&Co. KG, Ulm, Niemcy). Na potrzeby testu opracowano także maskę dla programu analizującego uwzględniającą wprowadzane parametry próbek (tj. średnice zewnętrzne i wewnętrzne kości, długość kości, rozstaw podpór) (181). Analiza wytrzymałościowa szyjki kości została przeprowadzona na kości udowej prawej w oparciu o test kompresji. Na potrzeby testu zaprojektowano i wykonano specjalny trzpień do głowicy pomiarowej (uwzględniający krzywiznę głowy kości udowej) oraz regulowany uchwyt, który pozwolił na pozycjonowanie kości w pionie i precyzyjne ustawienie w osi działania siły obciążającej (Rycina 1). Kości udowe przed badaniami wytrzymałościowymi rozmrażano do temperatury pokojowej. Dla każdej kości oceniano moduł sprężystości Younga (E_{mod}), siłę maksymalną (F_{max}), granicę sprężystości (G_{sp}).



Rycina 1. Schemat działania głowicy pomiarowej w badaniu wytrzymałościowym.

8.4. Badanie biochemiczne.

Krew pobrano do próbek bez antykoagulantów (na tzw. skrzep). Po pobraniu krew odstawiono na około 40 minut w temperaturze pokojowej, a następnie odwirowano przy 3000 obrotów/min przez 10 minut. Uzyskaną surowicę odpipetowano do mniejszych próbek (w celu uniknięcia wielokrotnego rozmrażania całej próbki) i zamrożono w temperaturze -20°C do dalszych analiz wskaźników metabolicznych tkanki kostnej. Ocena wskaźników metabolicznych obejmowała pomiar stężenia w surowicy krwi C-końcowego telopeptydu kolagenu typu I (CTX-I) (nr kat. AC-06F1 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, UK), osteokalcyny (OC) (nr kat. AC-12F1 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, Wielka Brytania), a także specyficznej dla kości fosfatazy

zasadowej (nr kat. E-EL-R1109 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, Wielka Brytania) (182). Analizy przeprowadzono za pomocą ww. komercyjnych testów immunoenzymatycznych (ELISA) oraz czytnika do mikropłytek Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, LA, USA).

8.5. Analiza statystyczna uzyskanych wyników.

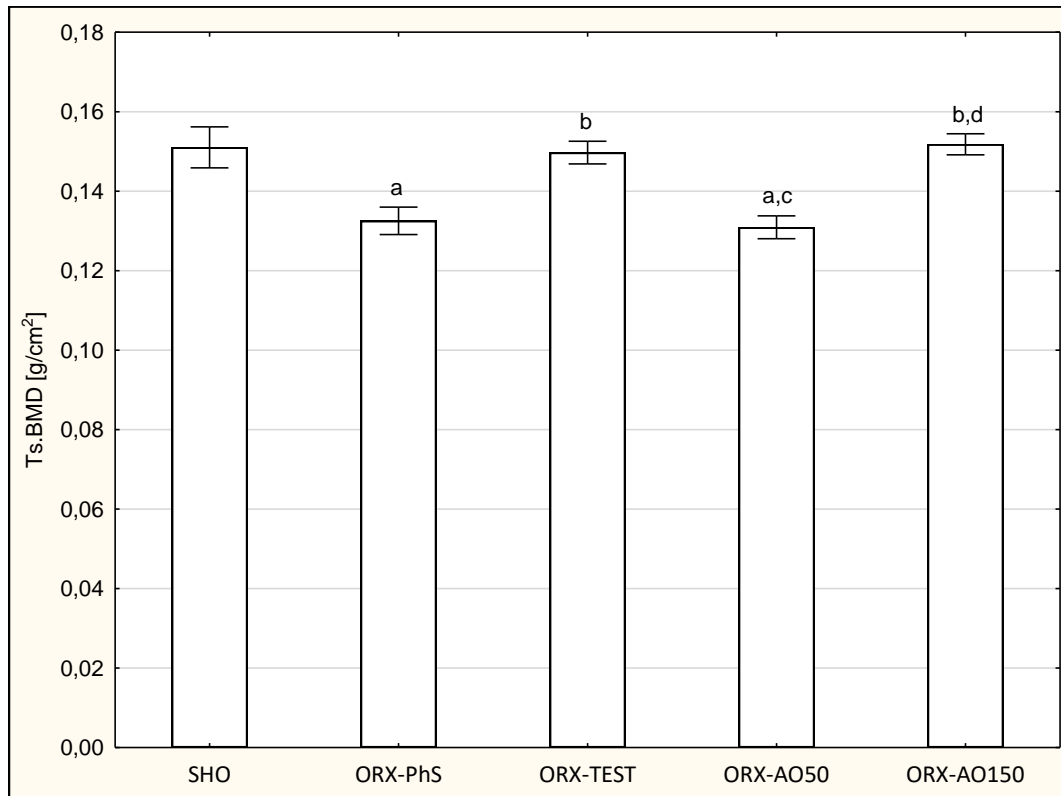
Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w postaci wartości średnich z błędem standardowym średniej ($x \pm \text{SEM}$). Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań wykonano przy pomocy programu STATISTICA 13.1 (TIBCO Software Inc. Palo Alto, CA, USA). Normalności rozkładu zmiennych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Różnice pomiędzy średnimi określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji Anova i testu post-hoc Tukeya dla równej liczebności próbek. Za różnice istotne statystycznie przyjęto wartości średnich przy $P \leq 0,05$.

9. Wyniki.

9.1. Analiza densytometryczna DXA.

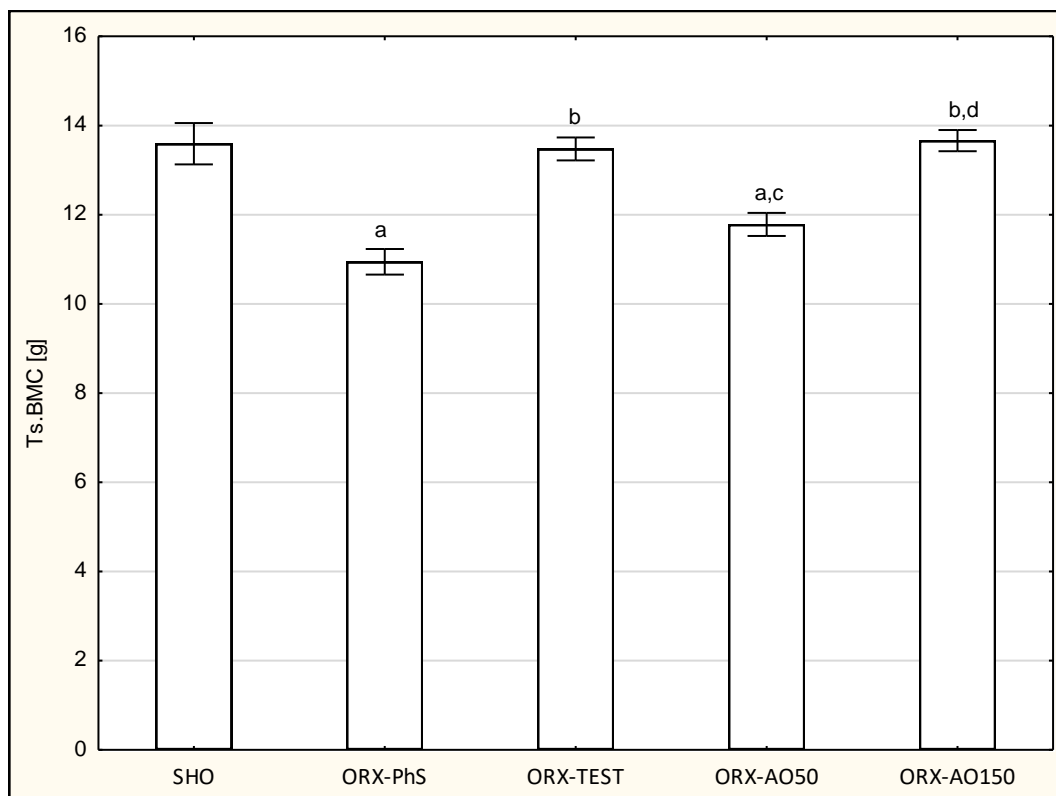
Analiza densytometryczna całego szkieletu (Ts.BMD, Ts.BMC, Ts.Area).

Analiza densytometryczna całego szkieletu wykazała, że orchidektomia statystycznie istotnie obniżyła wartości Ts.BMD i Ts.BMC całego szkieletu w porównaniu z grupą kontrolną operowaną rzekomo (SHO) (odpowiednio o 13,3% i 19,5%) (Rycina 2; Rycina 3). Podawanie testosteronu w dawce 7 mg/kg m.c w grupach kontrolnych wykazało efekt osteoprotekcyjny, a wartości badanych parametrów (Ts.BMD, Ts.BMC) pozostawały na zbliżonym poziomie, jaki był obserwowany w grupie poddanej operacji rzekomej (SHO).

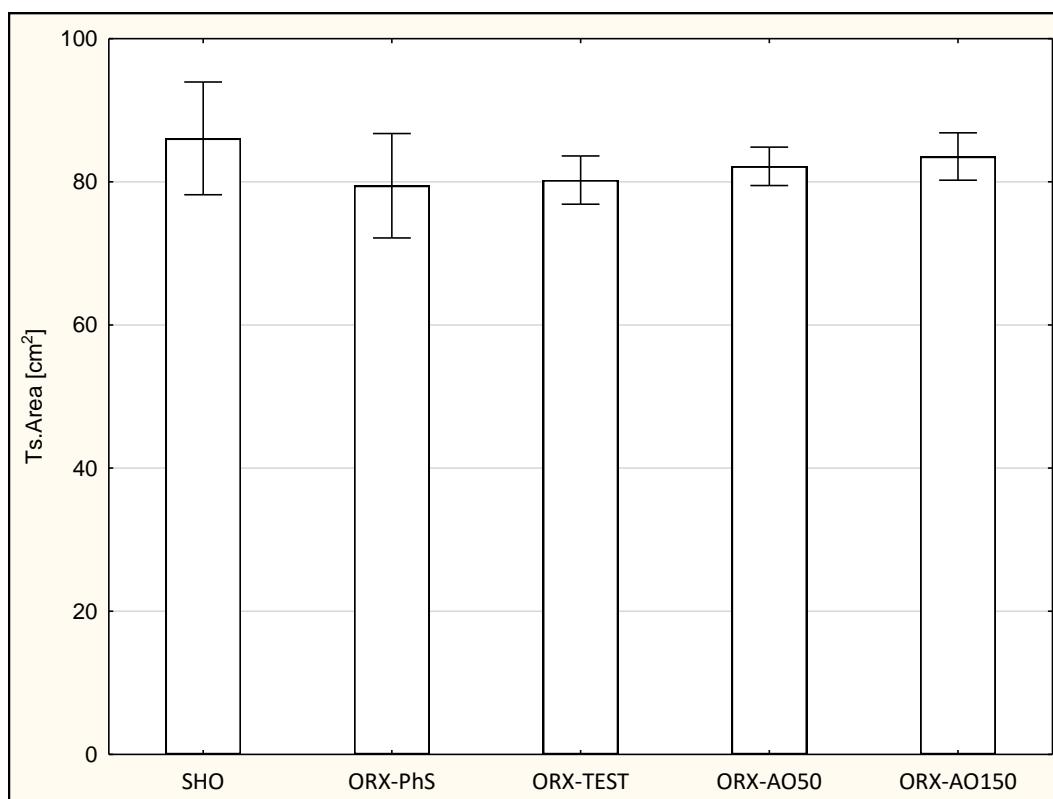


Rycina 2. Gęstość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Analogiczna sytuacja miała również miejsce w grupach otrzymujących wyższe dawki oleju arganowego (ORX-AO150). Zaobserwowano tam istotnie statystyczny ($p < 0,05$) wzrost wartości Ts.BMD i Ts.BMC do poziomu obserwowanego w grupach kontrolnych (SHO i ORX-TEST).



Rycina 3. Zawartość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

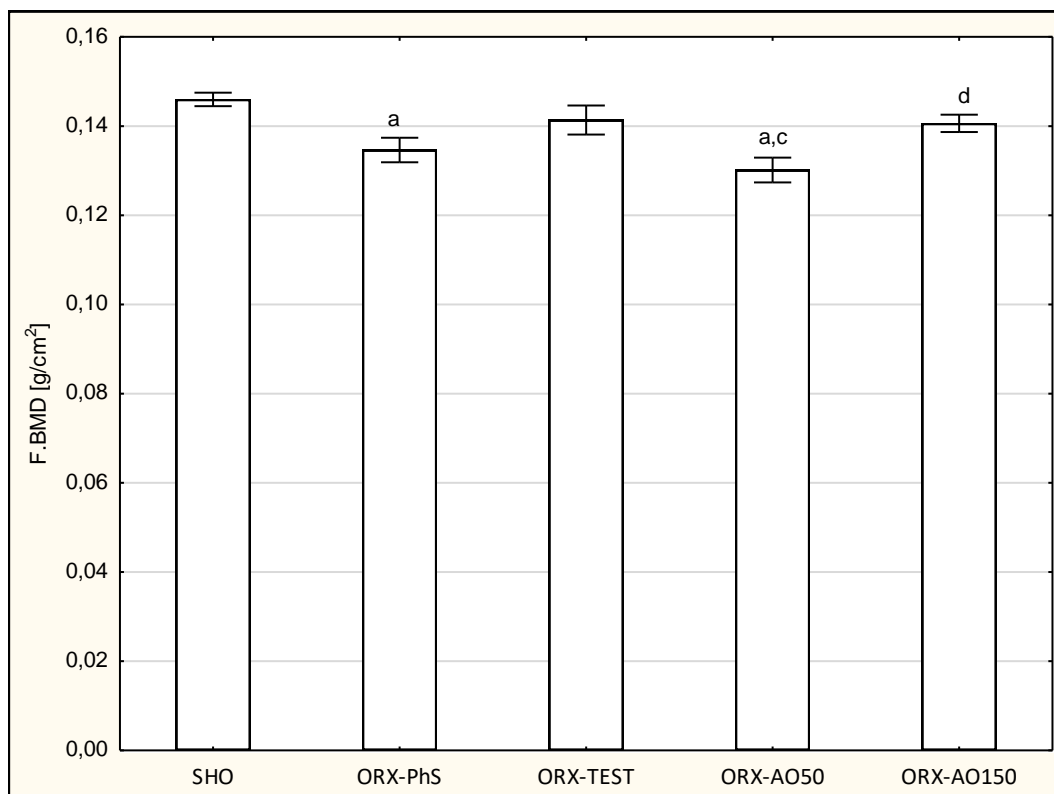


Rycina 4. Powierzchnia tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.Ar) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

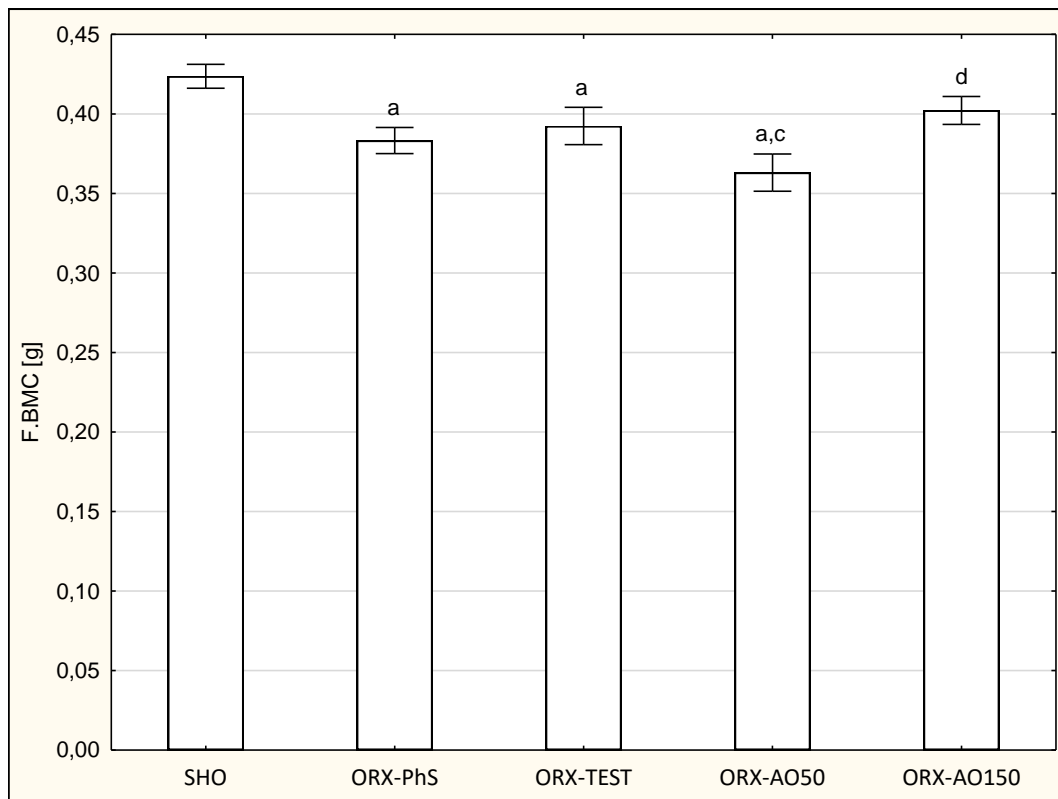
Analiza całkowitej powierzchni szkieletu (Ts.Area) wykazała nieistotny spadek wartości tego parametru w grupie ORX-PhS (7,7%). Podawanie testosteronu oraz oleju arganowego w dawce 0,5 i 1,5 ml/100 g m.c wywołało tendencję do zahamowania spadku wartości Ts.Area kośćca badanych szczurów (Rycina 4).

Analiza densytometryczna (DXA) całych kości udowych (F.BMD, F.BMC, F.Area).

Analiza densytometryczna całych kości udowych wykazała istotnie statystycznie mniejsze wartości gęstości mineralnej (F.BMD) kości i zawartości mineralnej (F.BMC) w grupach poddanych operacji orchidektomii w porównaniu do grupy kontrolnej rzekomo operowanej (odpowiednio 7,8% i 9,5%). Podawanie wyższych dawek oleju arganowego zahamowało tę niekorzystną tendencję. Zaobserwowano istotnie zwiększenie zarówno wartości F.BMD jak i F.BMC w badanych grupach (ORX-AO150) (Rycina 5).

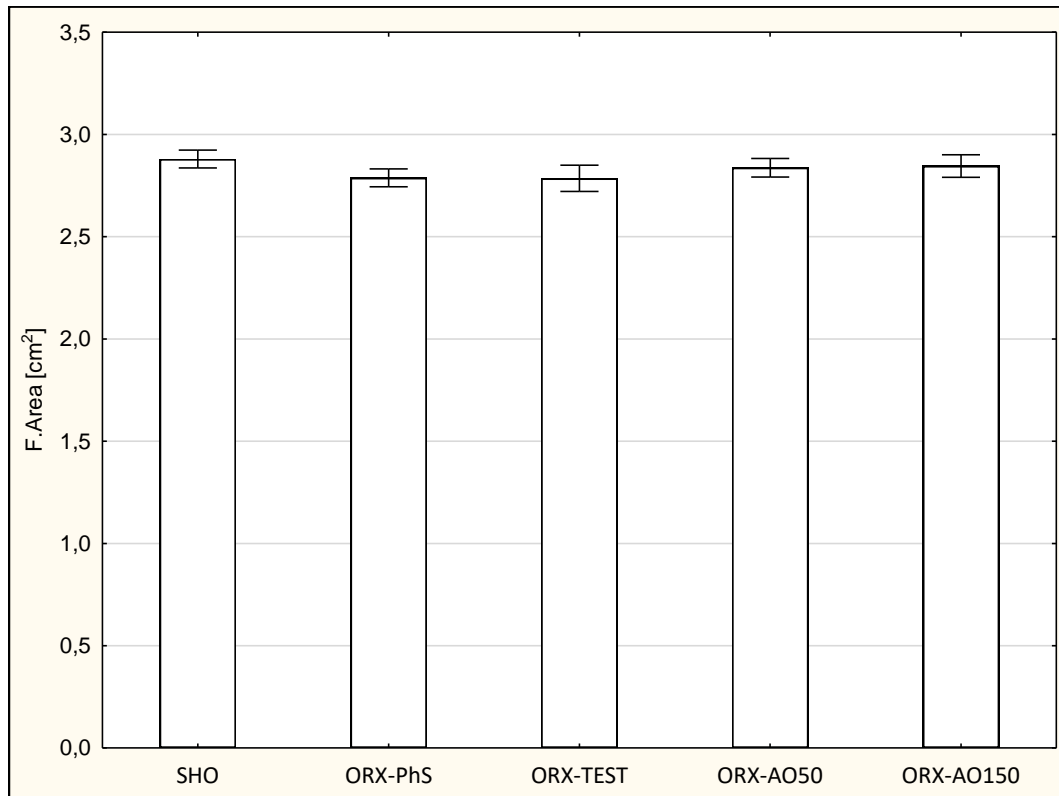


Rycina 5. Gęstość mineralna tkanki kostnej kości udowych (F.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.



Rycina 6. Zawartość mineralna tkanki kostnej kości udowych (F.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

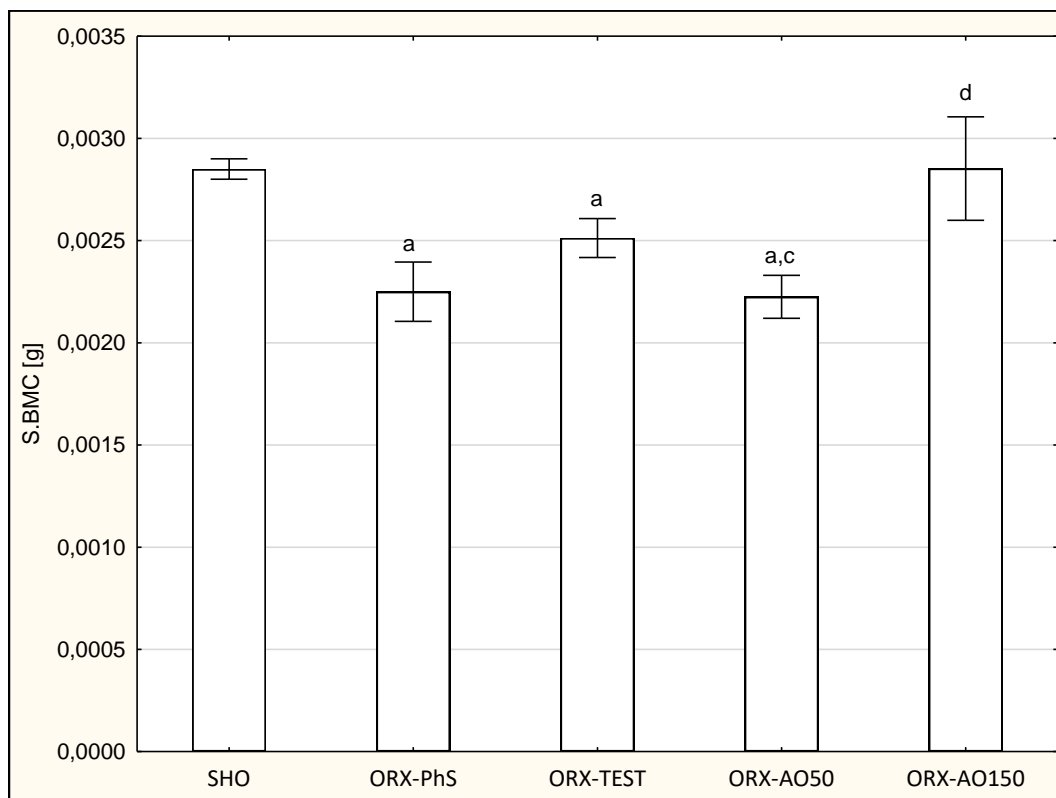
W przypadku F.BMC otrzymane w grupie ORX-AO150 wyniki były wyższe niż w orchidektomizowanej grupie kontrolnej otrzymującej testosteron (o 2,4%) (Rycina 6). Podobną tendencję wzrostową obserwowano również w odniesieniu do F.BMD. W obu przypadkach nie zanotowano, jednakże istotności statystycznej. Orchidektomia nie wpłynęła w znaczący sposób na powierzchnię kości udowych (F.Area) (Rycina 7). Badany parametr był jedynie o 3,1 % niższy w grupach ORX-PhS i ORX-TEST, podczas gdy w grupach otrzymujących olej arganowy (zarówno ORX-AO50 jak i ORX-AO150) wartości tego parametru pozostawały na zbliżonym do grupy SHO poziomie. Obserwowane zmiany nie wykazywały cech istotności statystycznej.



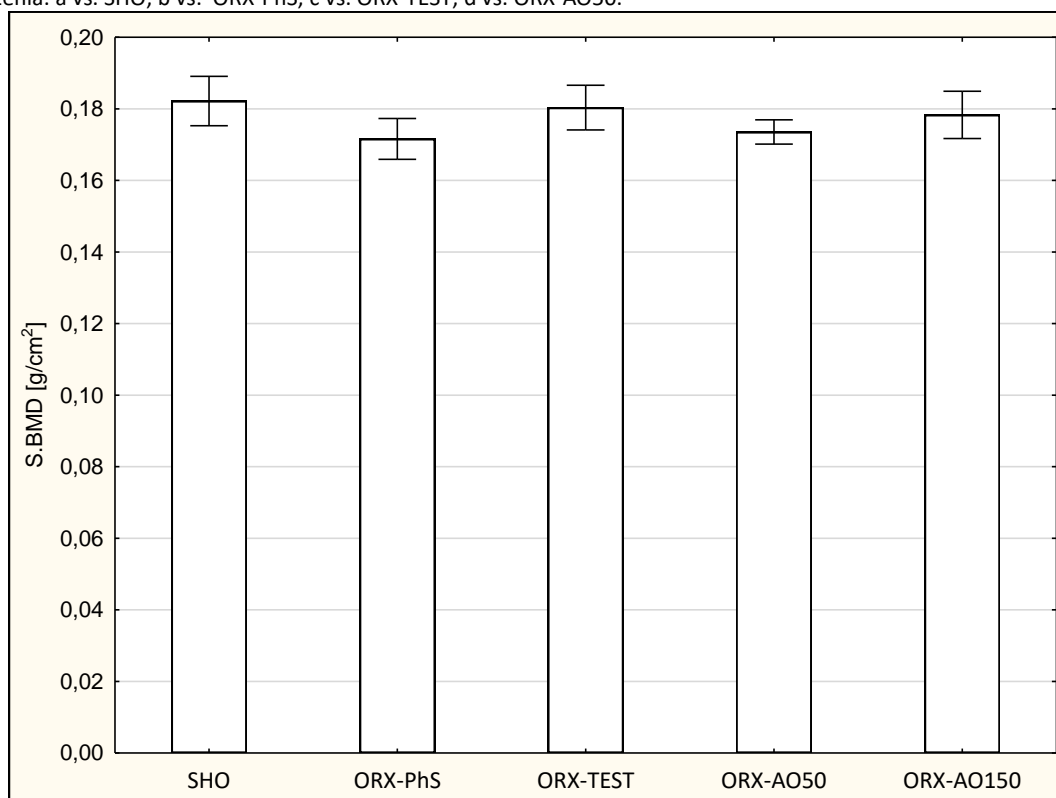
Rycina 7. Powierzchnia tkanki kostnej kości udowych (F.Area) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Analiza densytometryczna (DXA) szyjki kości udowej (S.BMD i S.BMC)

Analiza densytometryczna szyjki kości udowej wykazała, iż samce szczurów poddanych operacji orchidektomii (ORX-PhS) cechują się istotnie niższymi wartościami S.BMC ($p < 0,05$), w porównaniu do grupy kontrolnej poddanej operacji rzekomej (SHO). Najniższe wartości stwierdzono w grupie ORX otrzymującej płyn fizjologiczny. Podawanie testosteronu w grupie ORX-TEST zahamowało tę tendencję, natomiast suplementacja orchidektomizowanych szczurów wysokimi dawkami oleju arganowego nie tylko zahamowała ten proces, ale spowodowała również, istotny statystycznie wzrost wartości S.BMC aż o 26,1 % (vs. ORX-PhS). W grupie gdzie stosowano testosteron (ORX-TEST) wartości ocenianego parametru były większe o 16% ($p < 0,05$). Mniejsze dawki oleju (grupa OA50) nie wywarły hamującego wpływu na utratę zawartości mineralnej tkanki kostnej spowodowanej orchidektomią (Rycina 8).



Rycina 8. Zawartość mineralna tkanki kostnej szyjki kości udowych (S.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

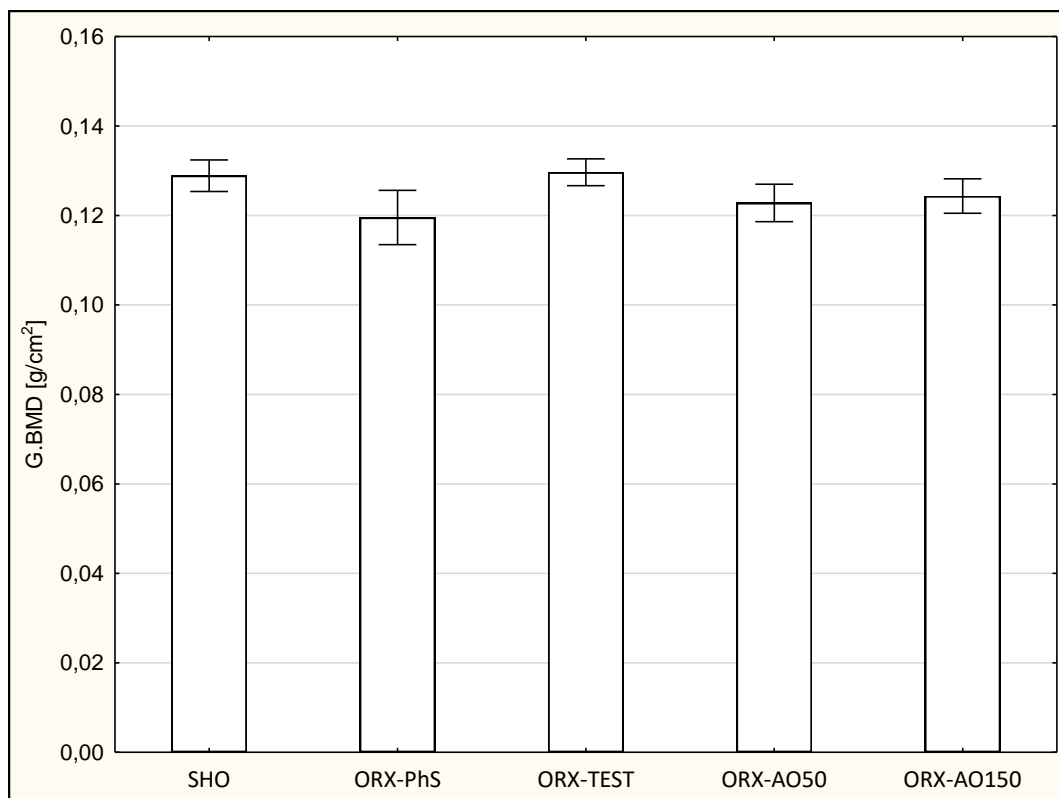


Rycina 9. Gęstość mineralna tkanki kostnej szyjki kości udowych (S.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

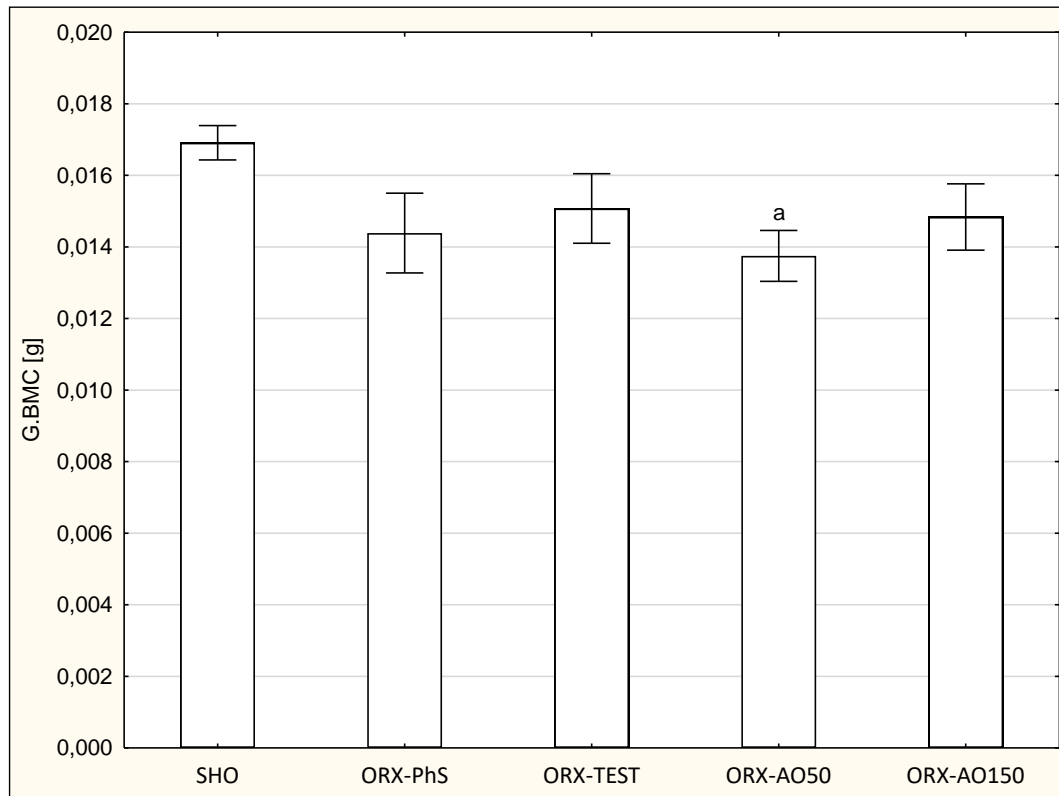
Podobną tendencję zaobserwowano również w stosunku do gęstości mineralnej szyjki kości udowych (S.BMD) badanych szczurów (Rycina 9).

Analiza densytometryczna (DXA) głowy kości udowej (G.BMD i G.BMC).

Analiza densytometryczna głowy kości udowej orchidektomizowanych szczurów wykazała niższe wartości G.BMC i G.BMD w grupie ORX otrzymującej płyn fizjologiczny w stosunku do grupy kontrolnej SHO. Podawanie testosteronu w grupie ORX-TEST ograniczyło zmiany zanikowe tkanki kostnej, utrzymując wartości G.BMC i G.BMD na poziomie grupy operowanej rzekomo. Podobny efekt wywołały większe dawki oleju arganowego, nie stwierdzono, jednakże istotności statystycznych w badanych grupach (Rycina 10; Rycina 11).



Rycina 10. Gęstość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowych (G.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.



Rycina 11. Zawartość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowych (G.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

9.2. Analiza tomograficzna pQCT.

Analiza całkowitego przekroju poprzecznego trzonu izolowanych kości udowych.

Tomograficzna ocena kości udowych samców wykazała istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmniejszenie całkowitej zawartości mineralnej (Tot.BMC) tkanki kostnej trzonu kości udowych szczurów poddanych operacji orchidektomii w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo (o 8,6%). Zaobserwowano natomiast, że zastosowanie testosteronu w grupie kontrolnej ORX-TEST zahamowało ten niekorzystny spadek badanego parametru. Również większa dawka oleju arganowego wykazała działanie protekcyjne. Wartości TOT-CNT w tej grupie były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) większe w porównaniu do grupy ORX-PhS (o 7,8%), a zmierzone wartości były na poziomie grupy otrzymującej testosteron i minimalnie niższe niż w grupie kontrolnej SHO (Tabela 4).

Podobną zależność obserwowano również w odniesieniu do całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej mierzonej w 50% długości kości (Tot.vBMD). Podanie większej dawki oleju arganowego istotnie zwiększyło (o 5,6 %, przy $p < 0,05$) gęstość mineralną w porównaniu do grupy orchidektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny. Odnotowano również prawie 2% wzrost wartości badanego parametru w odniesieniu do grupy kontrolnej SHO (bez cech istotności statystycznej). Ocenie poddano również całkowitą powierzchnię przekroju kości udowej (Tot.Ar). W tym przypadku zarówno testosteron jak i obie dawki oleju arganowego zwiększyły wartości badanego parametru w stosunku do grupy orchidektomizowanej ORX-PhS. Statystycznie największy wzrost w porównaniu do grupy ORX-PhS (o 6,6 % przy $p < 0,05$) miał miejsce w grupie ORX-AO150, a odnotowane wartości były na poziomie obserwowanych w grupie kontrolnej operowanej rzekomo. W grupie ORX-AO50 wartości całkowitej powierzchni przekroju kości udowej były jedynie o 1,1% niższe niż w grupie SHO (Tabela 4).

Ocena tkanki kostnej zbitiej trzonu kości.

Orchidektomia miała statystycznie istotny ($p < 0,05$) wpływ na obniżenie zawartości mineralnej tkanki kostnej zbitiej (Ct.BMC). W porównaniu do grupy kontrolnej (SHO) najniższe wartości obserwowano w grupie ORX-PhS (zmniejszenie o 9,4 %). Działanie osteoprotekcyjne obserwowano natomiast w grupie otrzymującej testosteron, gdzie wartości pozostawały na poziomie grupy kontrolnej SHO oraz w grupie otrzymującej wyższą dawkę oleju arganowego (ORX-AO150). Odnotowane w niej wartości były istotnie ($p < 0,05$) wyższe w porównaniu do grupy ORX-PhS i pozostawały na poziomie grupy ORX-TEST, a również co należy podkreślić, były tylko o 1,6 % niższe niż w grupie operowanej rzekomo (SHO) (Tabela 4).

Ocena wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitiej (Ct.vBMD) w 50% długości kości nie wykazała istotnych różnic w wartościach badanego parametru. Odnotowane

dane pozostawały na zbliżonym poziomie, a różnice pomiędzy poszczególnymi grupami nie przekraczały 1% (Tabela 4).

Podawanie oleju arganowego w dawce 1,5 ml/100 g m.c wykazało natomiast pozytywny wpływ na powierzchnię tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar). Statystycznie istotnie większe ($p < 0,05$), w porównaniu do grupy orchidektomizowanej, wartości obserwowano w grupie ORX-AO150 i były one jedynie o 2,4% niższe niż w grupie operowanej rzekomo (SHO). Podobną tendencję obserwowano także w grupie ORX-AO50, jednak tutaj różnice w stosunku do grupy SHO wynosiły już 5,8% (Tabela 4).

Osteoprotekcyjny wpływ wyższych dawek oleju arganowego był widoczny w przypadku oceny grubości tkanki kostnej zbitej (Ct.Th). Odnotowane w grupie ORX-AO150 wartości tego parametru były istotnie ($p < 0,05$) większe od wartości w grupie orchidektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny (5,8%) i statystycznie nieistotnie mniejsze (3,7%) od grupy kontrolnej SHO. Podobną tendencję obserwowano także w grupie, która otrzymywała testosteron (ORX-TEST). Wynik w tej grupie były o 4,8% niższe niż w grupie kontrolnej operowanej rzekomo (Tabela 4).

Analiza wielkości obwodu zewnętrznego (Peri.C) jak i obwodu wewnętrznego (Endo.C) kości udowych samców szczurów poddanych zabiegom orchidektomii i otrzymujących olej arganowy w dwóch dawkach nie wykazała istotnych różnic w wartościach badanych parametrów (Tabela 4).

Tabela 4. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju trzonu kości oraz tkanki kostnej zbitej określone w połowie (50%) długości kości udowych.

	Parametr	SHO	ORX-PhS	ORX-TEST	ORX-PP50	ORX-PP150
Całkowity przekrój poprzeczny trzonu kości	Tot. BMC (mg/mm)	10,49 ±0,19	9,59 ±0,13 a	10,34 ±0,10 b	9,69±0,18 a,c	10,34±0,12 b,d
	Tot. vBMD (mg/mm ³)	990,30 ±18,71	955,31 ±10,12	973,45 ±17,67	940,25±7,55 a	1008,55±11,0 b,d
	Tot.Ar (mm ²)	10,62 ±0,11	10,05 ±0,18 a	10,20 ±0,2	10,50±0,16	10,71±0,11 b,c
Tkanka kostna zbita trzonu kości	Ct. BMC (mg/mm)	9,63 ±0,11	8,73 ±0,13 a	9,36 ±0,13 b	9,04±0,16 a	9,47±0,17 b,d
	Ct.vBMD (mg/mm ³)	1452,81 ±6,82	1442,72 ±7,09	1454,81 ±6,03	1451,33±4,85	1448,85±3,66
	Ct. Ar (mm ²)	6,63 ±0,12	5,94 ±0,5 a	6,31 ±0,07	6,24±0,17 a	6,47±0,16 b
	Ct. Th (mm)	0,71 ±0,01	0,65 ±0,01 a	0,68 ±0,01 a	0,67±0,01 a	0,68±0,01 b
	Peri.C (mm)	11,55 ±0,12	11,23 ±0,18	11,31 ±0,18	11,48±0,17	11,59±0,16
	Endo.C (mm)	7,07 ±0,15	7,17 ±0,19	7,05 ±0,06	7,31±0,12	7,29±0,11

Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Analiza całkowitego przekroju poprzecznego dalszej części przynasadowej kości udowych (Tot.BMC, Tot.vBMD, Tot.Ar)

Analiza całkowitej zawartości mineralnej kości (Tot.BMC) w dalszej części przynasadowej kości udowej samców szczurów wykazała istotnie statystycznie ($p<0,05$) obniżenie wartości badanego parametru (o 11,8%) w grupie orchidektomizowanych samców otrzymujących płyn fizjologiczny w porównaniu do grupy kontrolnej SHO. Podawanie zarówno testosteronu w grupie kontrolnej (ORX-TEST) jak i większej dawki oleju arganowego (ORX-AO150) wywołało efekt osteoprotekcyjny, a wartości Tot.BMC były statystycznie istotnie ($p<0,05$) wyższe w obu grupach.

Wzrost wartości Tot.BMC w stosunku do grupy ORX-PhS był na poziomie 15,4% w grupie ORX-AO150 oraz 8,9% w grupie ORX-TEST. Analogiczna sytuacja miała miejsce w odniesieniu do całkowitej wolumetrycznej gęstości mineralnej przekroju kości w dalszej części przynasadowej (Tot.vBMD). Również w tym przypadku, większa dawka oleju arganowego statystycznie istotnie ($p < 0,05$) zwiększyła wartości Tot.vBMD o 12,6% vs. ORX-PhS. Należy podkreślić, że otrzymane wyniki były o prawie 4% większe niż w grupie kontrolnej operowanej rzekomo, jednakże bez istotności statystycznej. Olej arganowy wpłynął również pozytywnie na całkowitą powierzchnię kości udowych (Tot.Ar) analizowaną w dalszej części przynasadowej. Dawka 1,5 ml/100 g m.c OA statystycznie istotnie zwiększyła wartości Tot.Ar w porównaniu do grupy ORX-TEST (13,02%, przy $p < 0,05$). Również mniejsza dawka wykazywała podobną korzystną tendencję (wzrost o 2,9%). Należy podkreślić, że obie dawki OA wykazały większe wartości Tot.Ar niż obserwowane w grupie kontrolnej SHO, jednakże bez istotności statystycznej (Tabela 5).

Analiza tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej kości udowych (Tb.BMC, Tb.vBMD, Tb.Ar).

Analiza dalszej części przynasadowej kości udowych szczurów poddanych zabiegom orchidektomii wykazała negatywny wpływ, braku sterydowych hormonów płciowych, na tkankę kostną gąbczastą. Uzyskane wyniki wskazują na statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek (o 24,4%) zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC) w grupie orchidektomizowanych samców otrzymujących płyn fizjologiczny. Podawanie oleju arganowego wywołało efekt osteoprotekcyjny zwłaszcza w odniesieniu do wyższej dawki. W grupie ORX-AO150 parametry Tb.BMC były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe (35,5%) w porównaniu do grupy ORX-PhS oraz o 7,9% w stosunku do grupy ORX-TEST (Tabela 5).

Tabela 5. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju oraz tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej kości udowych szczurów.

	Parametr	SHO	ORX-PhS	ORX-TEST	ORX-AO50	ORX-AO150
Całkowity przekrój poprzeczny dalszej części przynasadowej kości udowych	Tot. BMC (mg/mm)	12,79 ±0,33	11,27 ±0,17 a	12,27 ±0,21 b	11,68 ±0,38 a	13,01 ±0,29 b,d
	Tot. vBMD (mg/mm³)	654,39 ±13,61	604,17 ±4,64 a	638,74 ±7,89	599,07 ±10,01 a	680,22 ±22,02 b,c,d
	Tot.Ar (mm²)	19,61 ±0,36	18,04 ±0,6	19,19 ±1,07	19,75 ±0,77	21,69 ±0,69 b,c
Tkanka kostna gąbczasta dalszej części przynasadowej	Tb. BMC (mg.mm)	2,78 ±0,09	2,11 ±0,1 a	2,65 ±0,11 b	2,26 ±0,1 a	2,86 ±0,09 b,d
	Tb.vBMD (mg.mm³)	331,81 ±10,55	241,07 ±12,92 a	303,74 ±10,72 b	236,13 ±10,03 a,c	289,42 ±14,19 a,b,d
	Tb.Ar (mm³)	8,82 ±0,16	8,13 ±0,21	8,63 ±0,15	8,89 ±0,34 b	9,76 ±0,31 a,b,c,d

Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Analiza wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej kości udowych (Tb.vBMD) wykazała, podobnie jak w przypadku Tb.BMC, negatywne skutki braku hormonów sterydowych. Wyniki w grupie ORX-PhS były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) niższe w porównaniu do grupy kontrolnej SHO jak też w porównaniu do grupy kontrolnej ORX-TEST, odpowiednio 27,4% i 20,6%. Pozytywne efekty zaobserwowano natomiast po zastosowaniu oleju arganowego. Dawka 1,5 ml/100 g m.c zahamowała negatywne skutki braku aktywności hormonalnej gonad. W grupie ORX-AO150 wartości Tb.vBMD były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe od grupy ORX-PhS (20,1%) i tylko o 12,7% niższe od grupy kontrolnej operowanej rzekomo. Analogiczną sytuację dotyczącą wyższej dawki oleju arganowego obserwowano także w przypadku powierzchni tkanki kostnej gąbczastej (Tb.Ar) (Tabela 5). Grupa ORX-AO150 miała statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe wartości analizowanego parametru w odniesieniu do grupy SHO (10,6%), ORX-PhS

(20,5%) oraz grupy ORX-TEST (13,1%). Również grupa otrzymująca mniejszą dawkę oleju (ORX-AO50) wykazała tendencję wzrostową wartości tego parametru, jednakże bez cech istotności statystycznej.

Analiza tomograficzna szyjki kości udowej.

Badanie tomograficzne szyjki kości udowej przeprowadzono w miejscu przejścia głowy kości udowej w szyjkę ze względu na fakt, że jest to miejsce, gdzie najczęściej dochodzi do przerwania ciągłości tkanki.

Parametry przekroju poprzecznego szyjki kości udowej (Tot.BMC, Tot.vBMD, Tot.Ar)

Analiza całkowitej zawartości mineralnej kości (Tot.BMC) szyjki kości udowej wykazała statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek wartości tego parametru (o 11,9%) w grupie orchidektomizowanych samców w porównaniu do grupy kontrolnej SHO. Osteoprotekcyjne działanie oleju arganowego zaobserwowano natomiast w odniesieniu do większej dawki. Wartości Tot.BMC wykazały statystycznie istotny wzrost o 15,1% vs. ORX-PhS i 4,0% vs. ORX-TEST i utrzymywały się na poziomie odnotowanych w grupie kontrolnej rzekomo operowanej.

Podobną tendencję wykazała całkowita wolumetryczna gęstość mineralna kości Tot.vBMD. Grupa orchidektomizowana otrzymująca płyn fizjologiczny (ORX-PhS) wykazała statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek wartości tego parametru o 6,1% w porównaniu do grupy SHO. Natomiast podawanie oleju arganowego, zwłaszcza w większej dawce, zahamowało tę niekorzystną tendencję. Grupa ORX-AO150 miała o 2,7% wyższe wartości Tot.vBMD vs. ORX-PhS i jedynie 3,5% niższe niż grupa kontrolna SHO (Tabela 6).

Operacja orchidektomii statystycznie nieistotnie obniżyła wartości powierzchni przekroju całkowitego (Tot.Ar) szyjki kości udowej Tot.Ar o 8,1% w grupie ORX-PhS w porównaniu do grupy kontrolnej SHO. Natomiast podawanie oleju arganowego nie wpłynęło w istotny sposób na

wartości Tot.Ar szyjki kości udowej, które pozostawały w obu grupach tj. ORX-AO50 i ORX-AO150 na zbliżonym do siebie poziomie (Tabela 6).

Ocena tkanki kostnej zbitej szyjki kości udowej (Ct.vBMD, Ct.BMC, Ct.Ar, Ct.Th).

Analiza tomograficzna tkanki kostnej zbitej szyjki kości udowej wykazała statystycznie istotne obniżenie wartości Ct.BMC w grupie orchidektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny (o 17,1%, przy $p < 0,05$) (Tabela 6). Podawanie testosteronu jak i większej dawki oleju arganowego zahamowało tę niekorzystną tendencję. Grupa kontrolna otrzymująca testosteron (ORX-TEST) wykazała wartości na poziomie grupy SHO, natomiast w grupie ORX-AO150 zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej była tylko o 2,5% niższa niż w grupie kontrolnej operowanej rzekomo i 2,6% niższa niż w grupie ORX-TEST. Analiza wolumetrycznej gęstości mineralnej Ct.vBMD tkanki kostnej zbitej (Tabela 6) wykazała, większą jej odporność na brak oddziaływania hormonów sterydowych jader. Wyniki w grupie ORX-PhS były statystycznie istotnie niższe o 3,5% od grupy kontrolnej SHO. Podanie testosteronu oraz oleju arganowego wpłynęło stabilizująco na analizowany parametr. Różnica wartości Ct.vBMD pomiędzy grupą SHO a ORX-TEST wynosiła zaledwie 1,1%. Natomiast w grupie gdzie stosowano większą dawkę oleju arganowego (ORX-AO150) wartości Ct.vBMD były o 1,5% większe niż grupie kontrolnej operowanej rzekomo (Tabela 6).

Dalsza analiza tomograficzna tkanki kostnej zbitej wykazała, że brak aktywności hormonalnej gonad wywołuje zmiany osteopeniczne przejawiające się statystycznie istotnym ($p < 0,05$) zmniejszeniem zarówno powierzchni tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar) jak i jej grubości (Ct.Th) w grupie ORX-PhS odpowiednio o 16,4% i 12,8% vs. SHO. Podawanie testosteronu jak i większej dawki oleju arganowego wywarło pozytywny skutek na omawiane parametry. Silniejsze działanie testosteronu odnotowano w przypadku Ct.Ar. Zaobserwowana tam różnica pomiędzy grupą ORX-PhS a ORX-TEST wynosiła 20,8%, natomiast w przypadku Ct.Th tylko 4,9%. Olej arganowy również

wykazywał zróżnicowane działanie. Wyższe dawki wykazały działanie osteoprotekcyjne, a odnotowane wartości zarówno w przypadku powierzchni tkanki kostnej zbitej jak i jej grubości były tylko o 3,5% niższe niż w grupie kontrolnej SHO, jednakże bez istotności statystycznej. W przypadku Ct.Ar również niższa dawka oleju arganowego wykazała tendencję wzrostową co do wartości badanego parametru (Tabela 6).

Tabela 6. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju poprzecznego, tkanki kostnej zbitej i tkanki kostnej gąbczastej szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych.

	Parametr	SHO	ORX-PhS	ORX-TEST	ORX-AO50	ORX-AO150
Przekrój poprzeczny szyjki kości udowych	Tot. BMC (mg/mm)	6,61±0,17	5,82±0,09 a	6,44±0,09 b	5,66±0,08 a,c	6,69±0,14 b,d
	Tot. vBMD (mg/mm ³)	1028±22,85	965,78±22,43 a	989,47±17,57	977,83±8,02	992,31±15,73
	Tot.Ar (mm ²)	6,52±0,21	6,00±0,32	6,53±0,28	5,76±0,17 a,c	5,98±0,18
Tkanka kostna zbita szyjki kości udowych	Ct. BMC (mg/mm)	4,89±0,13	4,05±0,18 a	4,91±0,15 b	4,12±0,16 a,c	4,77±0,09 b,d
	Ct.vBMD (mg/mm ³)	1253,93±2,50	1209,88±5,84 a	1240,16±8,03 b	1204,21±11,13 a,c	1272,81±9,64 b,c,d
	Ct. Ar (mm ²)	3,89±0,09	3,26±0,13 a	3,91±0,13 b	3,42±0,12 a,c	3,76±0,09 b
	Ct. Th (mm)	0,54±0,02	0,47±0,02 a	0,49±0,02	0,47±0,01 a	0,53±0,02
Tkanka kostna gąbczasta szyjki kości udowych	Tb. BMC (mg.mm)	2,58±0,10	2,18±0,06 a	2,72±0,06 b	2,02±0,08 a	2,74±0,07 b,d
	Tb.vBMD (mg.mm ³)	952,83±15,35	772,26±18,71 a	884,86±22,53 b	752,51±33,18 a,c	888,06±20,91 b,d
	Tb.Ar (mm ³)	2,93±0,16	2,71±0,11	3,05±0,11 b	2,63±0,10 c	2,83±0,12
Osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI)	RP_CM [mm ³]	2,79±0,11	2,20±0,11 a	2,66±0,13 b	2,35±0,11 a	2,52±0,11

Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Ocena tkanki kostnej gąbczastej szyjki kości udowej (Tb.vBMD, Tb.BMC).

Ocenię poddano również tkankę kostną gąbczastą. Analiza tomograficzna wykazała osteopeniczne efekty braku hormonów płciowych. Silniejszy efekt stwierdzono w przypadku wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMD), gdzie doszło do statystycznie istotnego obniżenia badanego parametru w grupie ORX-PhS vs. SHO (18,9%).

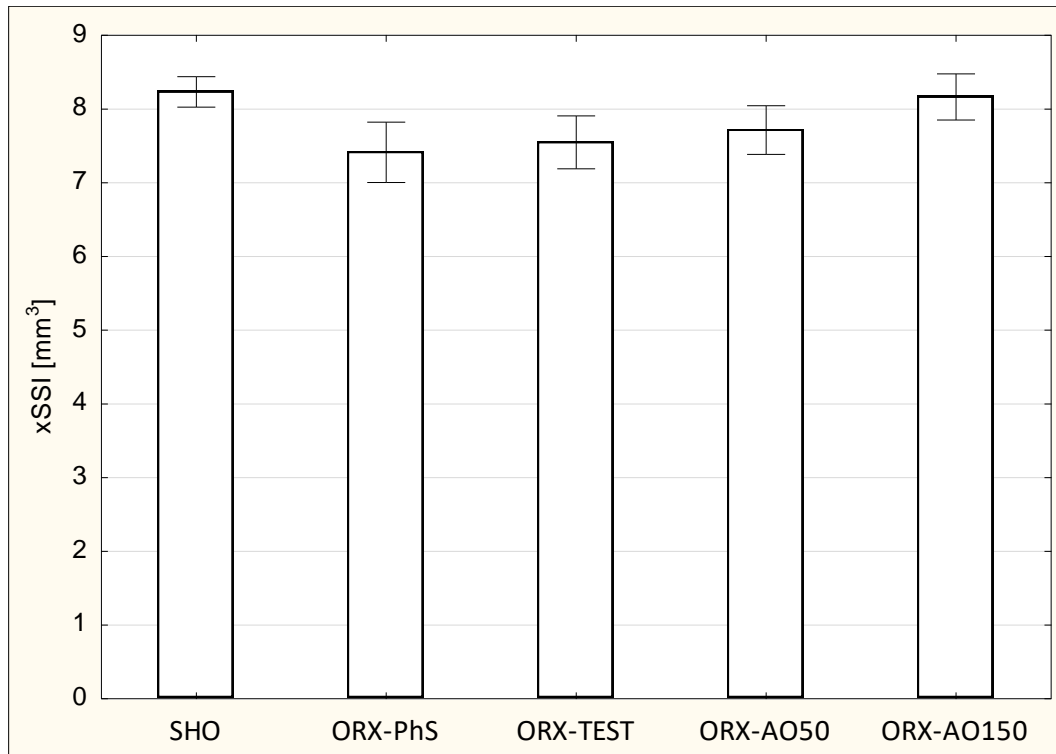
Podanie wyższej dawki oleju arganowego zahamowało niekorzystny wpływ braku hormonów sterydowych. Wartości (Tb.vBMD) w grupie ORX-AO150 były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe o 15% niż w grupie ORX-PhS i o 6,7% niższe niż w grupie kontrolnej SHO utrzymując się na poziomie grupy kontrolnej otrzymującej testosteron (Tabela 6).

W przypadku zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej brak aktywności hormonalnej skutkowało obniżeniem wartości (Tb.BMC) w grupie ORX-PhS (15,4%, przy $p < 0,05$). Efekt osteoprotekcyjny obserwowano natomiast w grupie ORX-AO150 gdzie wartości Tb.BMC były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe w stosunku do grupy ORX-PhS (wzrost o 25,1%) oraz 5,8% vs. SHO przy braku istotności. Należy podkreślić, iż wyniki uzyskane po zastosowaniu większej dawki oleju arganowego były na poziomie grupy kontrolnej otrzymującej testosteron (ORX-TEST), jednakże nie wykazywały one cech istotności statystycznej (Tabela 6).

9.3. Analiza wytrzymałościowa tkanki kostnej kości udowych samców szczurów.

Przewidywana wytrzymałość mechaniczna kości udowych samców szczurów (RP-CM-W; xSSI).

Badanie tomograficzne wykazało, że kości udowe szczurów otrzymujących olej arganowy w dawce 1,5 ml/100 g m.c cechowały się wyższymi wartościami wskaźnika przewidywanej wytrzymałości mechanicznej (xSSI) w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo (10,12%) oraz grupy orchidektomizowanej otrzymującej testosteron (8,08%) mimo braku różnic istotnych statystycznie. Podobną tendencję zmian obserwowano także w grupie ORX-AO50 (Rycina 12).



Rycina 12. Osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI) kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych wyznaczony w badaniu pQCT. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Przewidywana wytrzymałość mechaniczna szyjki kości udowej (RP-CM-W; xSSI).

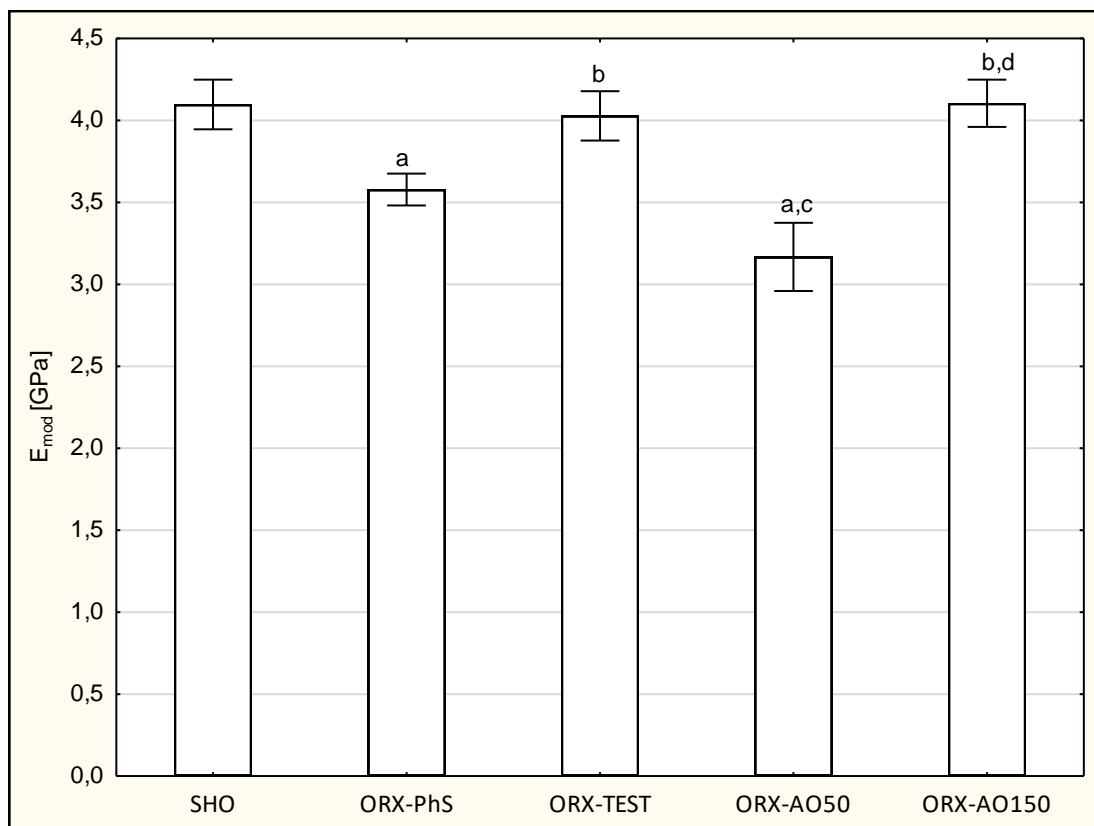
Operacje orchidektomii statystycznie istotnie ($p < 0,05$) obniżyły wskaźnik przewidywanej wytrzymałości tkanki kostnej mierzonej w szyjce kości udowej. Wskaźnik xSSI był o 21,1% procenta niższy w grupie ORX-PhS vs. SHO. Podanie oleju arganowego, zwłaszcza w większej dawce zahamowało tę niekorzystną tendencję. Wartości xSSI w grupie ORX-AO50 były o 7,3% większe niż w grupie ORX-PhS, natomiast w grupie ORX-AO150 o 9,3% jednakże, w obu przypadkach, bez istotności statystycznej. Wyniki w grupie ORX-AO150 były o 5,2% niższe niż w grupie otrzymującej testosteron (Tabela 6).

Analiza właściwości wytrzymałościowych kości udowych badana metodą trójpunktowego testu ugięcia.

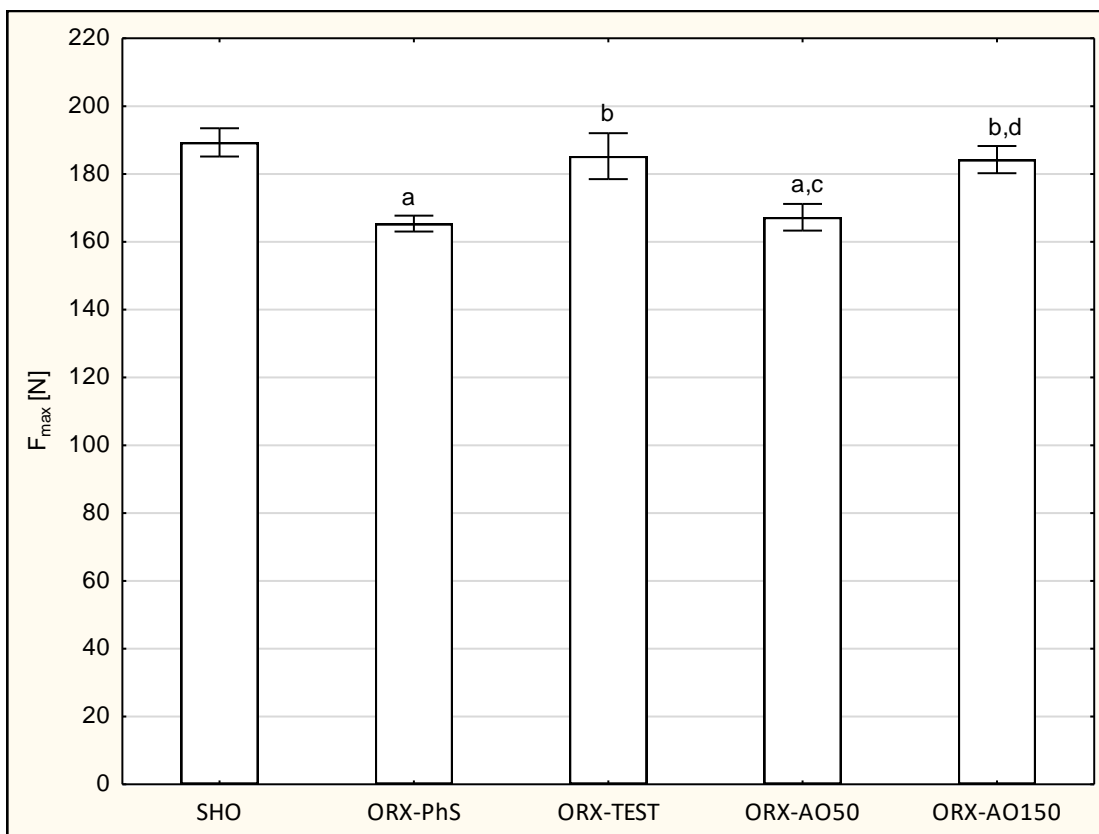
Parametry wytrzymałościowe kości udowej.

Badaniom wytrzymałościowym poddano również kości udowe samców szczurów. W przypadku modułu Younga (E_{mod}) olej arganowy podawany w dawce 0,5 ml/100 g m.c nie wykazał

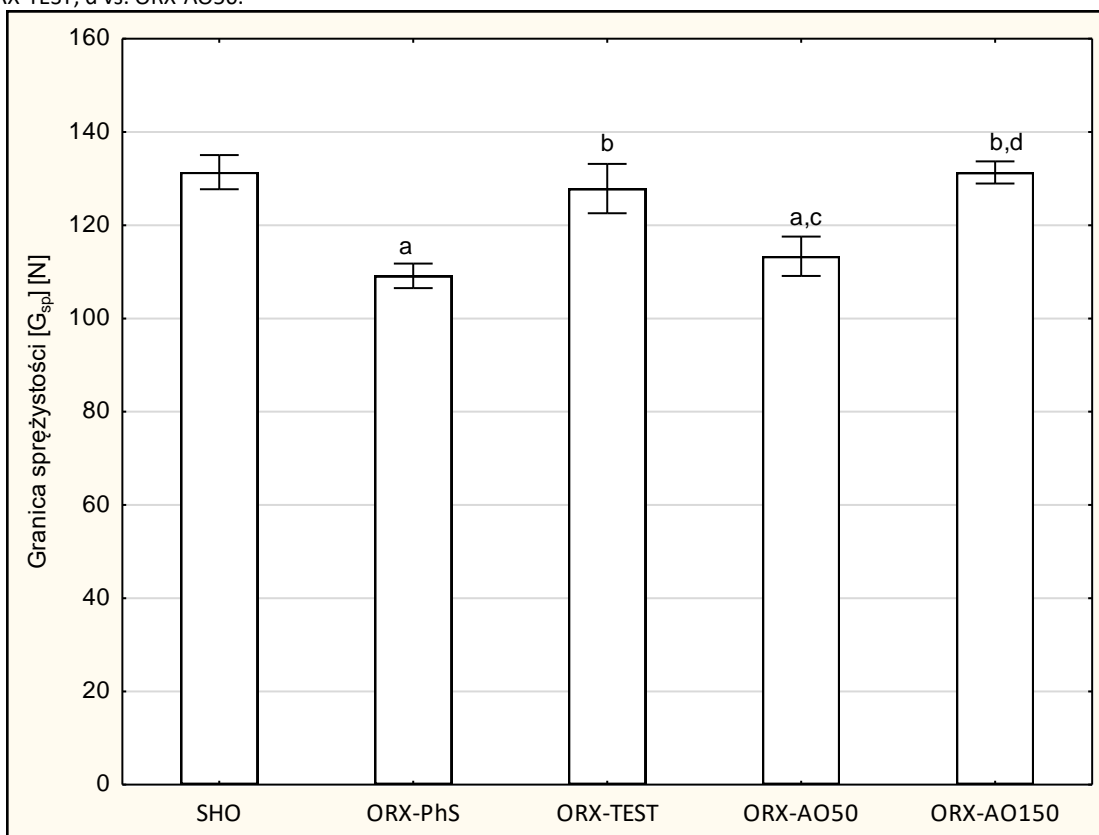
osteoprotekcyjnego wpływu na tkankę kostną w warunkach braku hormonów wywołanego operacjami orchidektomii. Przeciwny efekt obserwowano natomiast w przypadku dawki 1,5 ml/100 g m.c. Grupa ORX-AO150 miała statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe wartości modułu Younga w porównaniu do grupy ORX-PhS (wzrost o 14,5%) i pozostawała na zbliżonym poziomie do grupy SHO oraz ORX-TEST (Rycina 13). Również siła maksymalna (F_{max}) wykazywała podobną tendencję, a dawka 1,5 ml/100 g m.c oleju arganowego zahamowała niekorzystny wpływ operacji orchidektomii na tkankę kostną (Rycina 14).



Rycina 13. Moduł elastyczności Young'a kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.



Rycina 14. Siła maksymalna kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.



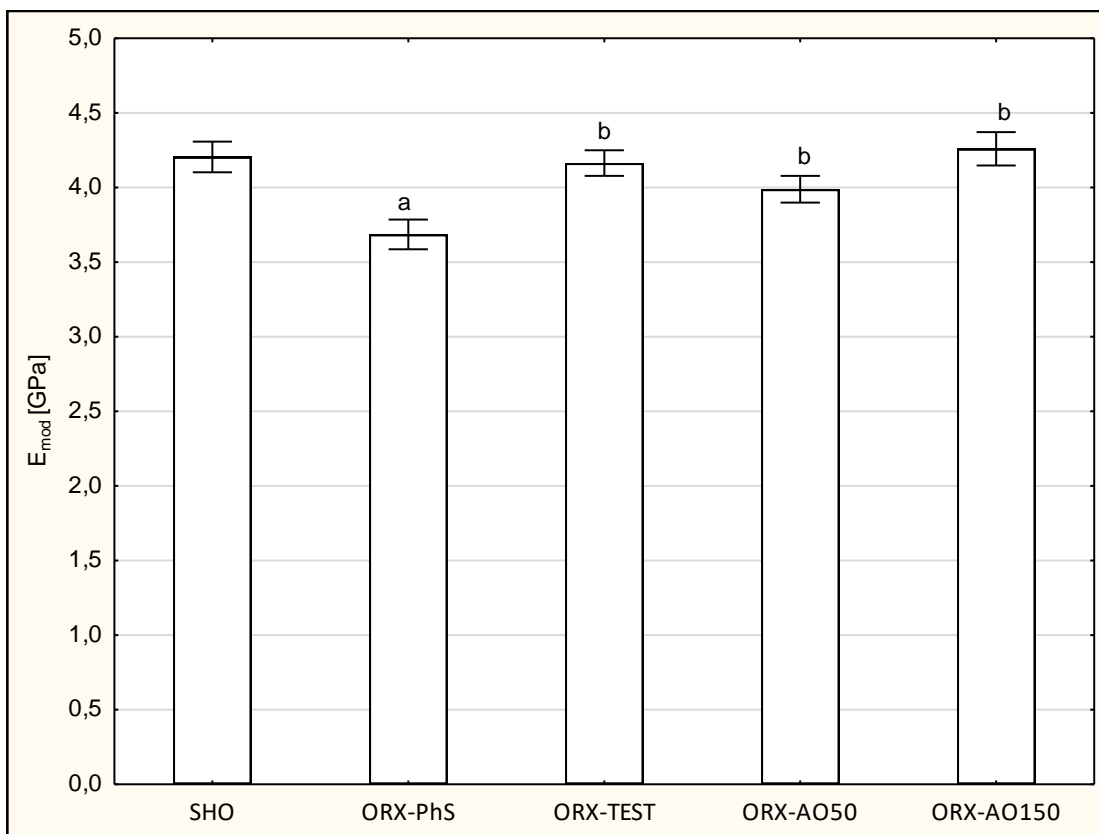
Rycina 15. Granica sprężystości kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Operacje orchidektomii wywarły niekorzystny wpływ na parametry wytrzymałościowe obniżając wartości granicy sprężystości (G_{sp}) badanych kości udowych. W grupie orchidektomizowanych samców otrzymujących płyn fizjologiczny odnotowano istotny statystycznie spadek badanego parametru o 16,9% w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo (SHO). Podanie większej dawki oleju arganowego zahamowało niekorzystny wpływ braku hormonów płciowych. W grupie ORX-AO150 wartości granicy sprężystości były statystycznie istotnie ($p < 0,05$) wyższe niż w grupie ORX-PhS (wzrost o 20,3%), a odnotowane dane były na poziomie grupy kontrolnej SHO (Rycina 15).

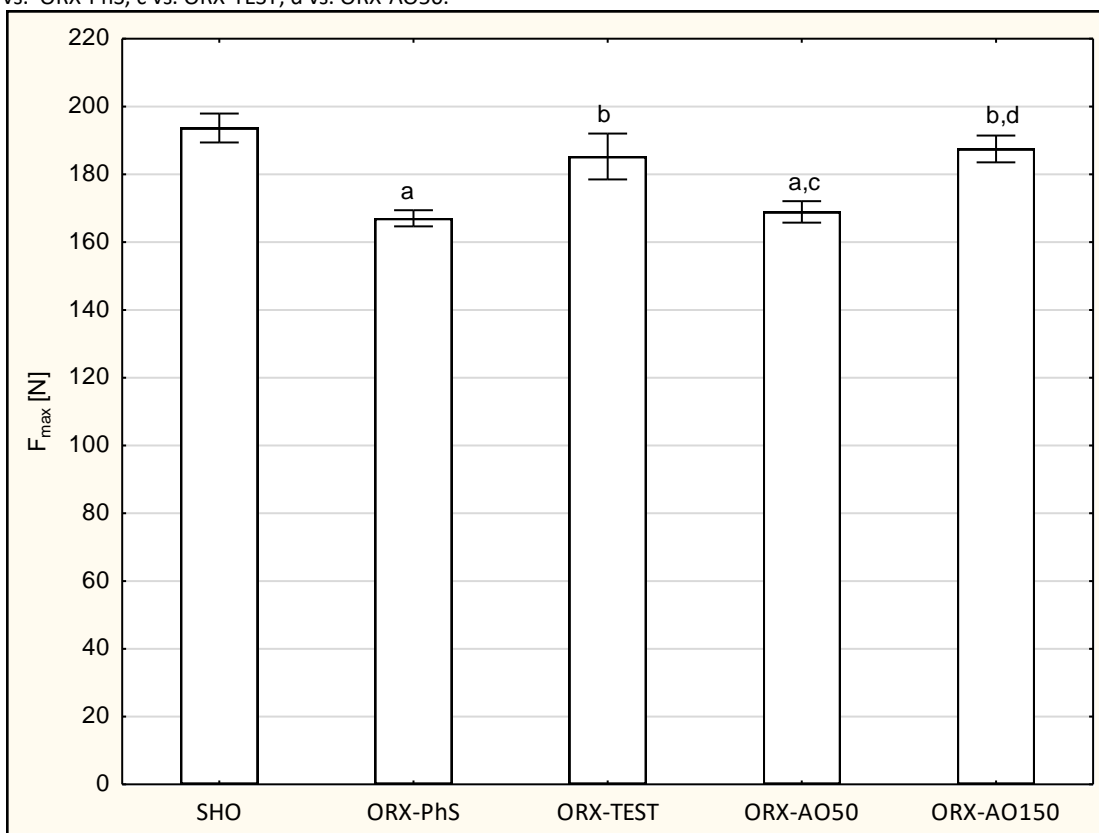
Parametry wytrzymałościowe szyjki kości udowej.

Badanie wytrzymałościowe szyjki kości udowej wykazało statystycznie ($p < 0,05$) istotny spadek wartości modułu Young'a (E_{mod}) w grupie orchidektomizowanych samców otrzymującej płyn fizjologiczny (o 12,3%). Podawanie oleju arganowego zarówno w dawce 0,5 jak i 1,5 ml/100 g m.c spowodowało zahamowanie tego niekorzystnego zjawiska. Obie stosowane dawki w sposób statystycznie istotny zwiększyły wartość badanego parametru w porównaniu do grupy ORX-PhS. Należy podkreślić, że wartości modułu Young'a po zastosowaniu większej dawki oleju arganowego pozostawały na zbliżonym poziomie do wartości obserwowanych w grupach ORX-PhS i ORX-TEST, natomiast w grupie ORX-AO50 odnotowane wartości E_{mod} były tylko o 5,2% niższe niż w grupie kontrolnej operowanej rzekomo i około 4,0% vs. ORX-TEST (Rycina 16).

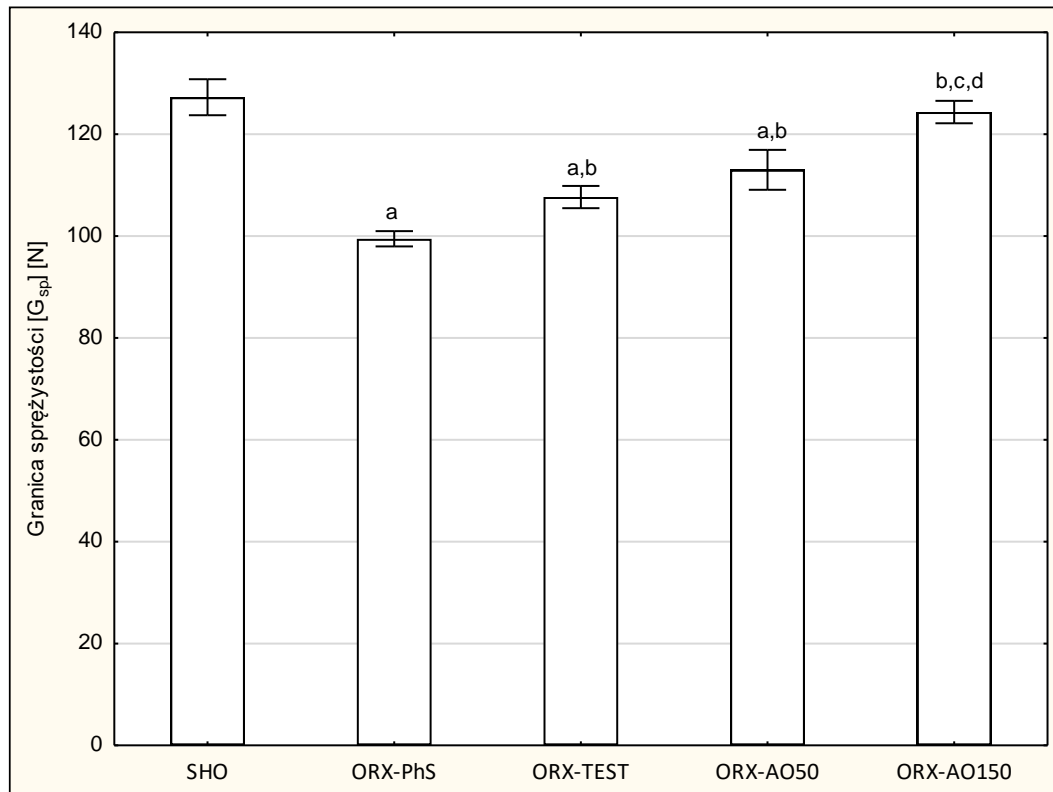
Podobny charakter zmian po zastosowaniu większej dawki oleju obserwowano w odniesieniu do siły maksymalnej (F_{max}). Wartości tego parametru były tylko o 3,1% niższe w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo i pozostawały na zbliżonym, do grupy ORX-TEST, poziomie (Rycina 17).



Rycina 16. Moduł elastyczności Young`a szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.



Rycina 17. Siła maksymalna szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

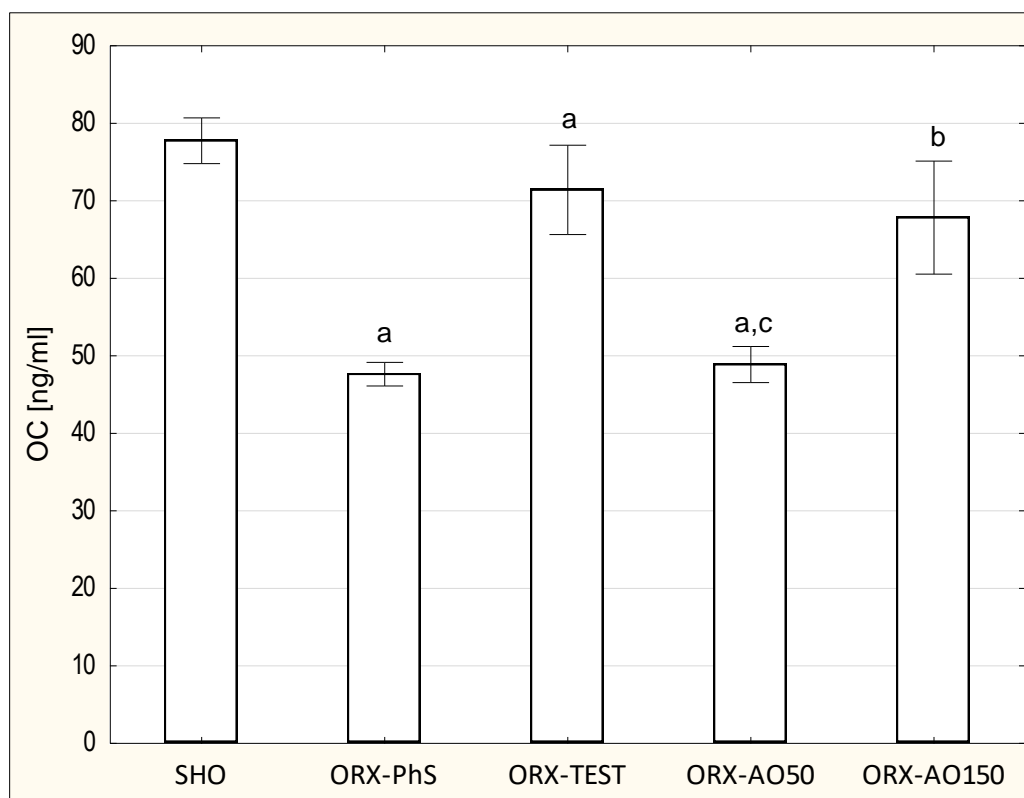


Rycina 18. Granica sprężystości szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Podczas badania wytrzymałościowego szyjki kości udowej określono również granicę sprężystości (G_{sp}). Najniższe wartości tego parametru odnotowano w grupie orchidektomizowanych szczurów otrzymujących płyn fizjologiczny. Były one statystycznie istotnie ($p < 0,05$) niższe o 21,8% w porównaniu do grupy kontrolnej SHO. Podanie oleju arganowego zahamowało tę niekorzystną tendencję. Zarówno dawka 0,5 jak 1,5 ml/100 g m.c w sposób istotny zwiększyły wartości badanego parametru zarówno w stosunku do grupy ORX-PhS jak i ORX-TEST, odpowiednio o 13,6% i 4,9% (dawka 0,5 ml) i 25,0% i 15,5% (dawka 1,5 ml). Należy również podkreślić, iż wartości w grupie otrzymującej większą dawkę oleju arganowego były tylko o 2,3% niższe niż w grupie operowanej rzekomo (Rycina 18).

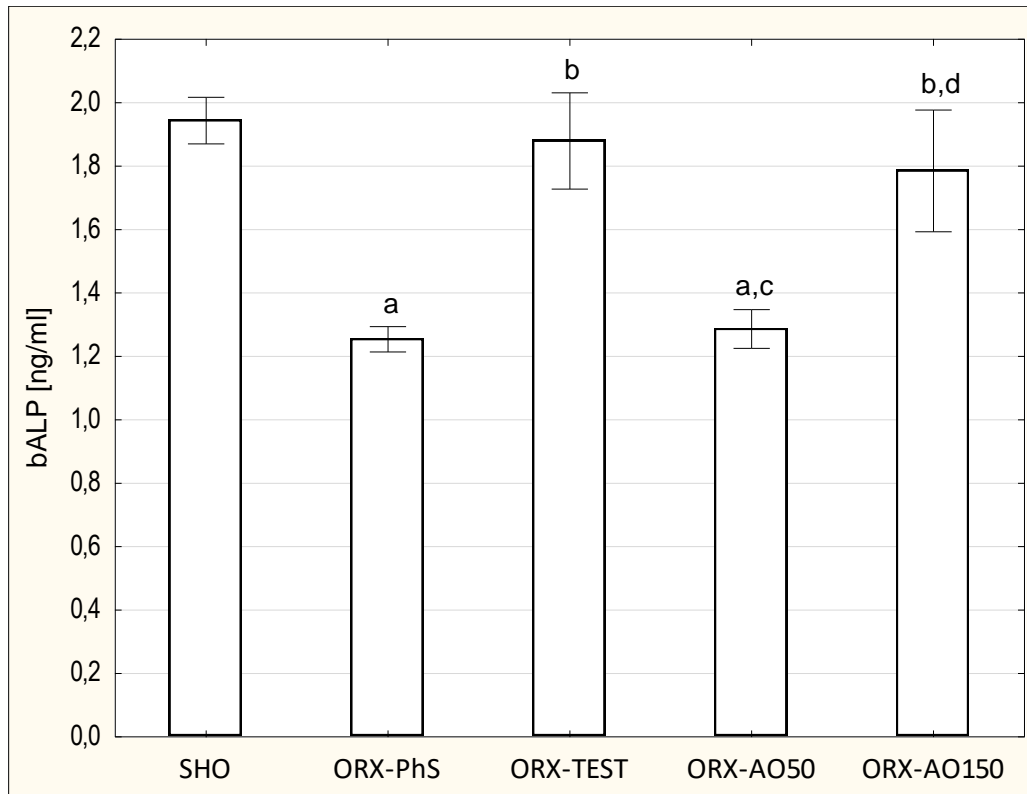
9.4. Parametry biochemiczne wskaźników metabolizmu kostnego.

Markery obrotu kostnego pozwalają na diagnostykę stanu metabolicznego układu kostnego i monitorowanie zachodzących procesów resorpcji i kościotworzenia. Prawidłowość tych procesów decyduje o zmienności masy kostnej obserwowanej w poszczególnych etapach rozwoju każdego organizmu. Oceniono markery osteogenezy tj. frakcję kostną fosfatazy zasadowej (bALP ang. bone alkaline phosphatase) i osteokalcynę (OC) oraz marker resorpcji: C-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha α kolagenu typu I (CTX). Operacje orchidektomii istotnie obniżyły stężenie OC w grupie ORX-PhS oraz grupie otrzymującej mniejszą dawkę oleju arganowego vs. do grupy SHO($p < 0,05$). Natomiast grupy ORX-TEST oraz ORX-AO150 wykazały tendencję wzrostową wartości badanego markera (Rycina 19).



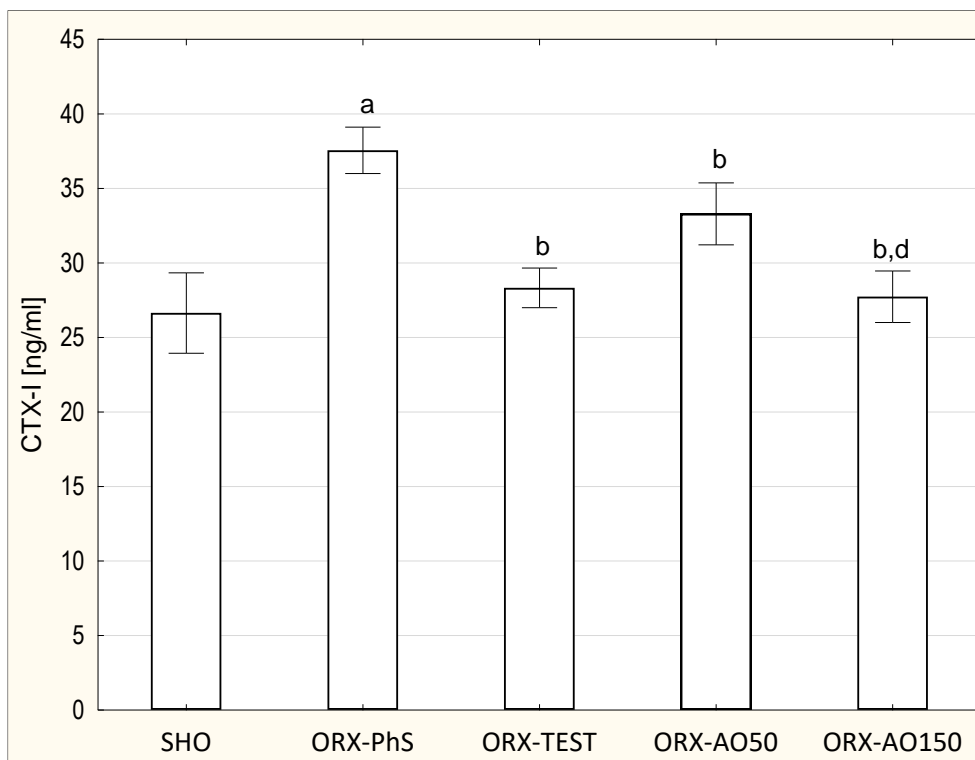
Rycina 19. Stężenie osteokalcyny (OC) w osoczu krwi samców szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Podobną tendencję zmian obserwowano również w odniesieniu do stężenia bALP. Także tutaj pozytywny efekt wywołało podanie większej dawki oleju arganowego (Rycina 20).



Rycina 20. Stężenie frakcji kostnej fosfatazy zasadowej (bALP) w osoczu krwi szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

Procesy resorpcji tkanki kostnej ocenione na podstawie stężenia CTX-I. Najintensywniej były one widoczne w grupie orchidektomizowanej otrzymującej płyn fizjologiczny (ORX-PhS) gdzie istotny wzrost ($p < 0,05$) w stosunku do grupy SHO był na poziomie blisko 41%. Również w tym przypadku podanie oleju arganowego w dawce 1,5 ml/100 g m.c wywarło pozytywny efekt, a obserwowane wartości były na poziomie grupy kontrolnej SHO oraz grupy otrzymującej testosteron (Rycina 21).



Rycina 21. Stężenie C-końcowego usieciowionego telopeptydu łańcucha kolagenu typu I (CTX-I) w osoczu krwi szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych.

Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.

10. Dyskusja

Zasadniczym celem leczenia osteoporozy jest unikanie złamań, a w przypadku ich wystąpienia zapobieganie kolejnym. Osteoporoza jest chorobą, którą należy leczyć wielopłaszczyznowo. Leczenie farmakologiczne powinno być ściśle powiązane z działaniami profilaktycznymi, w skład których wchodzi stosowanie właściwej, odpowiednio zbilansowanej diety bogatej w wapń, witaminę D i inne czynniki mające potencjalny wpływ na stan czynnościowo-jakościowy układu kostnego (11). Nie należy również zapominać o dobrze dobranej aktywności fizycznej, rehabilitacji oraz strategii zapobiegania upadkom, co może być również powiązane z leczeniem chorób współistniejących mogących mieć wpływ na zmysł równowagi (183). Paradoksalnie część badań sugeruje, że otyłość u osób dorosłych może być jednym z czynników mających wpływ na jakość tkanki kostnej. Jak podaje Evans i wsp. (2015) w badaniach przeprowadzonych na grupie 200 mężczyzn i kobiet ze zdiagnozowaną otyłością w wieku 25-45 oraz 55-75 lat osoby otyłe charakteryzowały się większym BMD w obrębie biodra i odcinka lędźwiowego kręgosłupa (w obu grupach wiekowych) (184). Podobne zależności były obserwowane w przypadku kości korowej oraz ilości beleczek kostnych badanych metodą HR-pQCT. Poziom BMD całego szkieletu również był istotnie wyższy u osób otyłych, ale tylko w starszej grupie wiekowej. Zaobserwowane różnice między osobami zdrowymi i otyłymi w starszej grupie wiekowej sugerują, że otyłość może chronić przed związaną z wiekiem utratą masy kostnej i może zwiększać szczytową masę kostną (184). Chociaż większe BMD w biodrze i odcinku lędźwiowym kręgosłupa może sugerować, że otyłość chroni przed złamaniami biodra i kręgow, to należy jednak pamiętać, że osoby otyłe mogą być bardziej narażone na upadki z powodu upośledzenia funkcji mięśni, otyłości sarkopenicznej i/lub nacieków tłuszczu w mięśniach szkieletowych. Inny kierunek upadku i siła upadku u osób otyłych mogą również przyczyniać się do większego ryzyka złamań kończyny dolnej i bliższej części kości ramiennej (185-187).

Zmiany osteoporotyczne tkanki kostnej, pojawiające się wraz z wiekiem, nadal stanowią wyzwanie diagnostyczne oraz terapeutyczne. Na pojawienie się osteoporozy wpływa wiele czynników, między innymi predyspozycja osobnicza, zaburzenia endokrynologiczne, choroby współistniejące, nieprawidłowa dieta i przyjmowane leki oraz czynniki środowiskowe. Zmiany w mikroarchitekturze tkanki kostnej oraz zaburzenia w jej strukturze zwiększają ryzyko złamań osteoporotycznych, jak również znacząco utrudniają gojenie się kości (188). Ze względu na trudności w gojeniu się złamań osteoporotycznych, istotne jest prowadzenie profilaktyki przeciwko procesom zanikowym w tkance kostnej. Osteoporoza jest często spotykanym schorzeniem, zwłaszcza u kobiet w okresie pomenopauzalnym, jednak dotyka także mężczyzn w okresie andropauzy (152). Choć zmiany związane z osteoporozą znacznie częściej obserwuje się u kobiet, to przebieg choroby u mężczyzn jest dużo poważniejszy, a ponadto towarzyszą jej zaawansowane objawy. W odniesieniu do wydłużającego się czasu życia społeczeństwa oraz prowadzonego stylu życia, bardzo istotne jest poznanie patomechanizmów leżących u podstaw osteoporozy oraz zapobieganie tym zaburzeniom. Istotnym jest, aby zachęcać społeczeństwo do prowadzenia zdrowego trybu życia, rozpoznawać chorobę w jej wczesnym stadium oraz motywować chorych do przestrzegania zaleceń. Osteoporoza, tuż za chorobami układu krążenia i nowotworami jest główną przyczyną śmierci pacjentów (189).

Złamania związane z osteoporozą stwarzają duże trudności w leczeniu ze względu na specyficzne cechy, które są mniej obecne w typowych złamaniach urazowych. Z powodu długotrwałego leżenia w łóżku i unieruchomienia, po złamaniu osteoporotycznym następuje przyspieszona utrata masy kostnej. Ze względu na istniejącą wcześniej niską masę kostną i słabą jakość tkanki kostnej złamania osteoporotyczne są z reguły wieloodłamowe co utrudnia prawidłową repozycję (189).

Metody terapeutyczne stosowane u mężczyzn są zbliżone do tych stosowanych u kobiet. Oprócz suplementacji wapniem czy witaminą D3 stosuje się również hormonalną terapię zastępczą testosteronem oraz bisfosfoniany (152). W ostatnich latach wykorzystuje się także możliwość ingerowania w szlaki metaboliczne odpowiadające za resorpcję tkanki kostnej np. terapię Denosumabem (190). Lek ten jest ludzkim ciałem monoklonalnym (z klasy IgG2) skierowanym przeciwko RANKL. Dzięki dużemu powinowactwu i swoistości wiąże się z RANKL, zapobiegając aktywacji jego receptora (RANK) na powierzchni prekursorów i dojrzałych osteoklastów. Uniemożliwienie połączenia RANK/RANKL skutkuje hamowaniem powstawania, funkcjonowania i przeżycia osteoklastów, co doprowadza do zmniejszenia procesów resorpcji zarówno warstwy korowej kości jak i kości beleczkowej (191).

Innym preparatem jest Romosozumab. To humanizowane przeciwciało monoklonalne wiążące białko sklerostynę, która wydzielana przez osteocyty silnie hamuje działanie kościotwórcze osteoblastów. Dzięki blokowaniu sklerostyny, dochodzi do nasilenia procesów kościotworzenia. Dodatkowo Romosozumab zmienia także ekspresję mediatorów tworzenia osteoklastów co zmniejsza resorpcję tkanki kostnej (131). Efektem jest zwiększenie masy kości korowych i beleczkowych wraz z poprawą struktury i wytrzymałości na działanie sił obciążających.

Z kolei bisfosfoniany, charakteryzują się bardzo dużym powinowactwem do składników mineralnych kości, ponieważ wiążą się z kryształami hydroksyapatytów i są wbudowywane w miejsca aktywnej przebudowy tkanki kostnej w stanach wzmożonego obrotu kostnego. Bisfosfoniany hamują rozpad hydroksyapatytów, przez co skutecznie powstrzymują resorpcję tkanki kostnej. To silne powinowactwo do struktury mineralnej kości i możliwość odkładania się w całym szkielecie spowodowało, że terapia bisfosfonianami jest główną metodą leczenia chorób metabolicznych układu kostnego, które charakteryzują się nadmierną lub nie zbilansowaną

przebudową kostną, gdzie aktywność osteoklastów i osteoblastów nie jest skorelowana, co prowadzi do nadmiernej resorpcji (192).

Porównując działanie Denosumabu i bisfosfonianów należy stwierdzić, że ten pierwszy wywiera silniejszy efekt antyresorpcyjny, co przejawia się między innymi mniejszą liczbą osteoklastów czy też mniejszą powierzchnią resorpcyjną. Natomiast niekorzystnym efektem działania obu tych substancji jest zwrotne hamowanie tworzenia kości. Uwidacznia się to poprzez równoczesne obniżenie markerów tworzenia jak i markerów resorpcji kości, co szczególnie jest widoczne w przypadku Denosumabu w porównaniu do bisfosfonianów. Po zaprzestaniu leczenia efekt działania Denosumabu utrzymuje się przez kilka miesięcy podczas gdy bisfosfonianów do kilku lat (190).

Niestety negatywnym efektem przyjmowania bisfosfonianów, oprócz zaburzeń ze strony układu pokarmowego, może być ich wpływ na wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej ze względu na sugestię, że ich stosowanie zwiększa ryzyko wystąpienia mikropęknięć w kościach. Ma i wsp. (2017) opublikowali wyniki badań osób w wieku 60-90 lat, z których wynika, iż w kościach osób stosujących terapię bisfosfonianami występowało o 24% więcej mikropęknięć niż w kościach osób chorych, którzy ich nie przyjmowali i aż o 54% więcej niż w zdrowo starzejących się kościach. Należy także pamiętać, że leki przeciwosteoporotyczne wyłącznie wzmacniają kości nie odbudowując ich struktury (193).

W leczeniu osteoporozy od wielu lat poszukuje się również alternatywnych metod zapobiegania temu schorzeniu. Stosowane były między innymi następujące substancje: atorowastyna (statyny), amlodipina (stosowana w stanach nadciśnienia-antagonista kanałów wapniowych), kalcytonina, raloxifen, risedronian, alfa-keto glutaran, laktoferyna, polifenole z zielonej herbaty, izoflawonoidy z soi (194-199).

Skutki uboczne stosowania preparatów farmakologicznych skłaniają do poszukiwania preparatów o charakterze suplementów czy dodatków diety, które z racji pochodzenia naturalnego, nie będą wykazywały działań niepożądanych, a jednocześnie stosowane przez dłuższy czas w początkowych etapach chorób metabolicznych lub przez całe życie (w przypadku dodatków do diety lub jej składników) mogłyby skutecznie spowolnić lub opóźnić rozwój osteoporozy (177). Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę określenia skuteczności działania oleju arganowego podawanego orchidektomizowanym samcom szczurów jako dodatku do diety o potencjalnym osteoprotekcyjnym wpływie, szczególnie w odniesieniu do złamania szyjki kości udowej. Wykorzystano metody pozwalające na ocenę stanu tkanki kostnej (DXA) z uwzględnieniem jej części korowej jak i beleczkowej (pQCT) oraz wytrzymałości mechanicznej na działanie sił obciążających co ma szczególne znaczenie w przypadku złamań kostnych.

Wyeliminowanie u samców wpływu sterydowych hormonów płciowych jest jednym z istotnych czynników negatywnie wpływających na metabolizm tkanki kostnej (178). Efektem tego było istotne zmniejszenie zarówno gęstości mineralnej jak i zawartości mineralnej tkanki kostnej w całym szkielecie badanych metodą densytometryczną. 60 – dniowy okres braku sterydowych hormonów płciowych pochodzenia gonadalnego obniżył BMD o 13,3% a BMC o ponad 19% w stosunku do grupy operowanej rzekomo. Podobne efekty były obserwowane również przez innych autorów. W pracy Ryu i wsp. (2016) wykazano znaczny spadek BMD po operacjach orchidektomii u młodych samców szczurów, a zwiększony obrót kostny spowodował, że resorpcja kości przewyższyła procesy osteogenezy (200). Tego typu zależności były obserwowane również przez innych autorów (201, 202). Co ciekawe podobne objawy, jak w przypadku orchidektomii chirurgicznej, obserwowano również w przypadku kastracji chemicznej przy użyciu preparatu Degarelix wykorzystywanego w leczeniu raka prostaty (203). Zastosowanie testosteronu skutkuje zahamowaniem zmian zanikowych tkanki kostnej całego szkieletu jak i kości udowej, mierzonych

densytometrycznie (DXA), co obserwowano w grupie ORX-TEST. Dane te są zgodne z obserwacjami Cauley i wsp. (204) oraz Snyder i wsp.(205). W przypadku oleju arganowego protekcyjny efekt był widoczny po zastosowaniu wyższej dawki (1,5 ml/100 g m.c), natomiast dawka 0,5 ml/100 g m.c nie ograniczyła utraty masy kostnej co miało swoje odzwierciedlenie w niższych wartościach zarówno Ts.BMD jak i Ts.BMC całego szkieletu oraz izolowanych kości udowych. Analiza densytometryczna szyjki kości udowych wykazała, iż operacje orchidektomii również w tej strukturze wywierają niekorzystny wpływ. Statystycznie istotnemu obniżeniu uległa zawartość mineralna tkanki kostnej szyjki (S.BMC) w grupie ORX otrzymującej płyn fizjologiczny. Dane te potwierdzają także wyniki otrzymane przez Nakamura i wsp. (206). Podanie testosteronu zahamowało ten spadek, natomiast podanie oleju arganowego wykazało zależność skuteczności od wielkości zastosowanej dawki. Dawka mniejsza nie wykazała efektu osteoprotekcyjnego w przeciwieństwie do dawki większej. Jej podanie skutecznie ograniczyło degradację materiału kostnego, a wyniki w tej grupie pozostawały na poziomie grupy kontrolnej SHO i były o 16% wyższe niż w grupie otrzymującej testosteron. Podobne zależności obserwowano także w odniesieniu do gęstości mineralnej, jednakże w przypadku tego parametru odnotowane zmiany były słabiej wyrażone, niż w przypadku BMC oraz nie wykazywały cech istotności statystycznej. W następstwie orchidektomii odnotowano tendencję do mniejszej powierzchni szkieletu (Ts.Area – 7,7%) oraz kości udowych (F.Area – 3,1%) w porównaniu do grupy operowanej rzekomo. Nie zaobserwowano również istotnego wpływu obu dawek oleju arganowego na Ts.Area i F.Area. Metoda DXA jest uznawana za tzw. „złoty środek” w badaniach układu kostnego i doskonale sprawdza się w diagnostyce osteoporozy ze względu na szybkość badania, zerową inwazyjność i znikomą dawkę promieniowania Rtg jaką przyjmuje pacjent. Jednakże technika ta posiada pewne ograniczenia. Badanie densytometryczne jest bowiem dwuwymiarowe. Zmierzona masa kostna przeliczana jest na jednostkę powierzchni, a otrzymany

wynik wyrażony w g/cm^2 . Wadą tej metody jest również nieuwzględnienie trzeciego wymiaru. Jeśli mierzymy dwie struktury o tej samej gęstości, ale o różnych grubościach, to wartość otrzymana w badaniu densytometrycznym struktury o większej grubości będzie większa.

W metodach tomograficznych (pQCT) pomiar dokonywany jest trójwymiarowo, a jego wynik wyrażony w g/cm^3 . Pozwala to na określenie rzeczywistej (wolumetrycznej) gęstości badanego obszaru, a także (co nie jest możliwe w metodzie DXA) na zróżnicowanie i ocenienie poszczególnych struktur kostnych tj. kości zbitiej (korowej), jak i gąbczastej (beleczkowej) (207). Zaletą obu tych metod jest natomiast możliwość dokonywania pomiarów zarówno w materiale izolowanym, jak i przyżyciowo.

Dodatkową zaletą i istotną przewagą tomografów na densytometrami jest możliwość zarejestrowania danych dotyczących geometrii przekroju kości w oparciu o obrysy obu struktur kostnych, co pozwala na określenie mechanicznych właściwości układu kostnego, które warunkują jego odporność na pęknięcia i złamania. Podstawą tej metody jest założenie, że o wytrzymałości kości na działanie sił obciążających decyduje część korowa, sposób jej rozmieszczenia na obwodzie kości, przekrój oraz grubość. Połączenie metody DXA i pQCT umożliwia kompleksową charakterystykę badanej tkanki kostnej zarówno w diagnostyce ludzkiej, jak i w badaniach naukowych opartych o modele zwierzęce (180, 207).

W toku doświadczenia analizie poddano tkankę kostną zbitą kości udowych, która generalnie charakteryzuje się mniejszą wrażliwością na czynniki powodujące degradację materiału kostnego. Efektem braku hormonów płciowych było zmniejszenie o około 1% wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej (Ct.vBMD). Odnotowano natomiast zmniejszenie zawartości mineralnej (Ct.BMC) oraz powierzchni tkanki kostnej zbitiej odpowiednio o 9,4% i 10,4%. Również pomiary szyjki kości udowej wykazały spadek wartości Ct.vBMD (3,5% przy $P < 0,05$) oraz Ct.BMC (17,1% przy $P < 0,05$). Podanie oleju arganowego zahamowało zmiany

zanikowe tkanki kostnej, ale pozytywny efekt zaobserwowano dopiero po podaniu wyższej dawki oleju. Pomiary wykonane techniką pQCT w połowie trzonu jak i w szyjce kości udowej wykazały wzrost wartości Ct.vBMD, Ct.BMC do poziomu obserwowanego w grupie SHO oraz w grupie otrzymującej testosteron. Podobne zależności dotyczące tkanki kostnej zbitej i ochronnego wpływu testosteronu wykazała Reim i wsp. (208). W przypadku mniejszej dawki obserwowano co prawda tendencję wzrostową analizowanych parametrów, jednakże okazała się ona zbyt mała. W przypadku tkanki kostnej zbitej należy również pamiętać o odmienności oddziaływania androgenów i estrogenów. W części periostealnej (podokostnowej) estrogeny działają hamująco na formowanie, podczas gdy androgeny stymulują tworzenie nowej tkanki. Z kolei odmienne procesy obserwowane są w odniesieniu do jamy szpikowej. W tym miejscu androgeny wykazują wpływ hamujący, podczas gdy estrogeny stymulują procesy kościotworzenia. Efektem takiego oddziaływania hormonów jest u samic ograniczenie formowania się tkanki kostnej, a przez to wolniejsze zwiększanie się obwodu zewnętrznego trzonu kości długich, z drugiej zaś strony intensywniejsze formowanie się tkanki kostnej na powierzchni trzonu od strony jamy szpikowej. U samców natomiast androgeny stymulują intensywne podokostnowe formowanie się tkanki kostnej co powoduje większy wzrost wymiaru poprzecznego kości (208). Z kolei oddziaływanie androgenów na wewnętrzną powierzchnię trzonu (od jamy szpikowej) jest niewielkie. Tempo dojrzewania układu kostnego jest ściśle związane z działaniem estrogenów jak i androgenów (mineralizacja jest wcześniejsza u samic), ale dla prawidłowego rozwoju układu kostnego konieczne jest u obu płci łączne oddziaływanie obu grup hormonów. Analizowane parametry geometryczne trzonu kości (PERI_C i ENDO_C) wykazały brak istotnych zmian w wielkości obwodu zewnątrzkościowego w poszczególnych grupach. Zmianom natomiast uległ obwód wewnętrzny obserwowany w grupie ORX-PhS oraz ORX-AO50. Zmiany wywołane brakiem hormonów gonadalnych widoczne były również w zmianach grubości warstwy korowej trzonu

kości udowych jak i szyjki. Istotne zmniejszenie Ct.Th miało miejsce w grupach orchidektomizowanych otrzymujących płyn fizjologiczny (9% trzon; 12,8% szyjka) oraz mniejszą dawkę oleju arganowego. W grupie ORX-AO150 wartości Ct.Th pozostawały na zbliżonym do grup SHO i ORX-TEST poziomie. W badaniach przeprowadzonych przez Yeh i wsp. (2019) obserwowano 4 tygodnie po kastracji tylko nieznaczne zmiany parametrów tkanki kostnej zbitiej, natomiast większą reaktywnością charakteryzowała się tkanka kostna beleczkowa, gdzie doszło do zmian w zakresie liczby beleczek ich separacji oraz współczynnika układu (209).

Tkanka kostna gąbczasta charakteryzuje się blisko ośmiokrotnie większą aktywnością metaboliczną w porównaniu do kości korowej (207). Dlatego też w jej obrębie wcześniej będą widoczne zmiany patologiczne dotycząc zaburzenia procesów metabolizmu kostnego, jak też efekty stosowania substancji mogących mieć wpływ na jego poprawę (209, 210). Badania własne potwierdzają tę właściwość. Analiza tomograficzna parametrów całkowitego przekroju poprzecznego w dalszej części przynasadowej kości udowych orchidektomizowanych szczurów wykazała, istotne zmniejszenie Tot.BMC (11,8%) i Tot.vBMD (7,7%) przekroju kości w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo. Kolejne analizy uwzględniające wyłącznie tkankę kostną gąbczastą w tym rejonie wyraźnie wykazały, iż brak hormonów gonadalnych istotnie ($p < 0,05$) zaburza procesy metaboliczne czego wyrazem było zmniejszenie wartości Tb.BMC (24,4%) , Tb.vBMD (27,4%) i Tb.Ar (7,8%). Istotnie niższe były również analizowane parametry (Tb.BMC, Tb.vBMD oraz Tb.Ar) w grupie otrzymującej mniejszą dawkę oleju arganowego. Dopiero podanie większej dawki wywołało efekt osteoprotekcyjny. Wartości Tb.BMC oraz Tb.Ar były odpowiednio o 2,5% i 10,6% wyższe niż w grupie SHO. Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMD) również wykazała tendencję wzrostową, aczkolwiek wyniki w grupie ORX-AO150 były niższe o 12,7% w porównaniu do grupy kontrolnej SHO i tylko o 4,7% w porównaniu do grupy otrzymującej testosteron. Analiza tkanki kostnej gąbczastej szyjki kości

udowej wykazała podobne jak w części dystalnej kości zmiany zanikowe spowodowane operacjami orchidektomii, obserwowane także przez innych autorów (206). Wolumetryczna gęstość mineralna (Tb.vBMD), zawartość mineralna (Tb.BMC) jak i powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej charakteryzowały się istotnie niższymi wartościami badanych parametrów w porównaniu do grupy kontrolnej operowanej rzekomo (18,0%, 15,4%, 7,5%). Efekt ochronny zaobserwowano po podaniu testosteronu oraz większej dawki oleju arganowego. Szczególnie korzystny efekt odnotowano w odniesieniu do zawartości mineralnej tkanki kostnej gąbczastej. Wyniki w grupie ORX-AO150 były 5,8% wyższe niż w grupie SHO i pozostawały na poziomie grupy otrzymującej testosteron. Podobne zależności dotyczące grupy ORX-AO150 vs. ORX-TEST obserwowano także w wartościach wolumetrycznej gęstości mineralnej. Zmiany zanikowe tkanki kostnej gąbczastej jakie były obserwowane w doświadczeniu dotyczą nie tylko kości długich (198, 211). Jak wynika z badań Gomes i wsp. (2021) 24-dniowy brak oddziaływania hormonów płciowych w doświadczeniu dotyczącym zarówno owariektomii jak i orchidektomii u szczurów spowodował istotne zmniejszenie BMD kości żuchw. W grupach kontrolnych, gdzie podawano estrogeny i testosteron obserwowano ich protekcyjne działanie, aczkolwiek silniejsze w odniesieniu do estrogenów (212).

Niezwykle istotną cechą układu szkieletowego jest jego odporność na działanie sił obciążających. Naturalnie powtarzające się cykliczne obciążenia szkieletu wynikające z aktywności życiowej organizmu (przede wszystkim ze zdolności do poruszania się) powodują wielokrotne odkształcenia tkanki kostnej w zakresie sprężystym. Cykliczność tych zmian oraz ilość zachodzących odkształceń w ciągu całego życia jest wartością niepoliczalną zależną od aktywności fizycznej. Z badań doświadczalnych dotyczących elementów/części maszyn wynika zjawisko tzw. zmęczenia materiału. Obserwacja zachowania się tkanki kostnej jako materiału podpórczego, poddawanego obciążeniom mechanicznym pozwoliła na sformułowanie tezy o

występowaniu tego zjawiska również w odniesieniu do materiału kostnego. W skutek powtarzających się cyklicznie obciążeń jakie towarzyszą aktywności fizycznej dochodzi do zmęczeniowego złamania beleczek kostnych i zaburzenia mikroarchitektury kości (213). Ważnym zadaniem procesów przebudowy tkanki kostnej jest usuwanie „zmęczonego” cyklicznymi obciążeniami materiału i zapobieganie osłabieniu odporności na działanie sił mechanicznych. Należy jednak mieć na uwadze, że jeżeli dojdzie do przekroczenia zdolności odtwórczych (przebudowy) w tkance kostnej to efektem tego będzie przerwanie jej ciągłości. Oprócz tego istnieje szereg czynników (farmakologicznych, środowiskowych, żywieniowych), które mogą wpływać na tempo obrotu kostnego, a tym samym na wytrzymałość tkanki kostnej (214, 215). Jednym z czynników mogących mieć pozytywny wpływ na wytrzymałość mechaniczną jest stosowanie wibracji o określonej częstotliwości. Jak wykazały badania Oxlund i wsp.(2003), na modelu owariotomizowanych szczurów, wibracje o częstotliwości 45Hz przez 30 minut/90 dni spowodowały zwiększenie szybkości tworzenia się części periostealnej (podokostnowej) oraz zahamowały resorpcję części endokortykałnej (216). Podobne zależności zaobserwował Rubin i wsp. (217-219).

Na podstawie badań struktury wewnętrznej kości uważa się, że kość zbita pełni głównie rolę mechaniczną (ochronną, podporową) natomiast kość gąbczasta metaboliczną, ale i również mechaniczną. Z punktu widzenia fizyki zewnętrzna (rurowa) część kości wzmocniona jest wewnętrzną siecią beleczek kostnych, których gęstość i rozmieszczenie nadaje szkieletowi maksymalną odporność na obciążenia powstające podczas przemieszczania się organizmu. Juliusz Wolff, który pod koniec XIX wieku sformułował swoje słynne prawo mówiące, że „Każdej zmianie w kształcie i czynności kości lub jedynie w ich czynności towarzyszą określone zmiany w wewnętrznej i zewnętrznej architekturze kości zgodnie z prawami matematyki” położył podwaliny w rozwój biomechaniki szkieletu (220, 221).

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. W przypadku wytrzymałości kości istotne znaczenie ma także pojęcie tzw. momentu bezwładności, który zależy od kształtu przekroju odniesionego do danej osi. Zwiększanie się wraz z wiekiem momentu bezwładności kości, poprzez zwiększanie się średnicy trzonów kości długich uważa się za zjawisko przystosowania się geometrii kości do zmniejszonej wytrzymałości tkanki kostnej np. w osteoporozie (213). Uważa się także, że brak okostnej na szyjce kości udowej jest pewnym ograniczeniem adaptacyjnym, co może pozostawać w korelacji z częstymi złamaniami tej okolicy u pacjentów w podeszłym wieku (222).

Zastosowanie podczas analizy tkanki kostnej badania tomograficznego pQCT pozwoliło na rejestrację danych dotyczących geometrii przekroju, obrysów obydwu struktur kostnych – zbitej i gąbczastej – oraz innych informacji służących 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 (ang. Strength Strain Index – SSI; Bone Strength Index - BSI) według tych samych punktów odniesienia (180). Zaletą tej metody jest jej nieinwazyjność, ponieważ podczas badania nie dochodzi do fizycznego uszkodzenia (złamania) kości i może być wykonywane przyżyciowo zarówno u ludzi jak i zwierząt.

Badania wytrzymałościowe kości mogą być również prowadzone na odpowiednio przygotowanych próbkach o określonym rozmiarze i kształcie lub całych kościach. W roku 1971 Burstein i Frankel (223) 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 przesuwającej 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 (224). 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 (213). 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 (181).

Analiza parametrów wytrzymałościowych całej kości udowej badanej w 3-punktowym teście ugięcia wykazała, że operacje orchidektomii istotnie obniżyły wartości siły maksymalnej, granicy sprężystości oraz modułu Younga w grupie ORX-PhS, co potwierdzają również badania

Gradosova i wsp. (194, 195). Analiza szyjki kości udowej wykazała podobne efekty orchidektomii. Również w tym przypadku brak hormonów płciowych skutkowało obniżeniem wytrzymałości kości na działanie sił obciążających i większą podatnością na uszkodzenie (złamanie) pod wpływem mniejszych sił obciążających. Podobne zależności były również obserwowane przez innych autorów (206, 225-228). Podanie mniejszej dawki oleju arganowego skutkowało tendencją wzrostową parametrów wytrzymałościowych badanych kości, jednakże dopiero większa dawka OA oraz podanie testosteronu w grupie kontrolnej ORX-TEST skutkowało poprawą analizowanych parametrów opisujących odporność tkanki kostnej na złamania. W grupie ORX-AO150 wartości F_{max} , G_{sp} oraz E_{mod} pozostawały na poziomie grupy kontrolnej operowanej rzekomo. Badanie układu kostnego w 3-punktowym teście ugięcia, jak już wspomniano wcześniej, jest możliwe dopiero po wyizolowaniu kości z organizmu, a więc pośmiertnie. Korzystając z metody tomograficznej pQCT można prognozować potencjalne zachowanie się tkanki kostnej poddanej obciążeniu, co pozwala na przewidywanie wytrzymałości mechanicznej w dowolnie wybranym miejscu. Może to być szczególnie przydatne w analizie najczęściej występującego złamania osteoporotycznego tj. złamania szyjki kości udowej. W przypadku kości udowej analizę xSSI przeprowadzono w tym samym miejscu trzonu, w którym później badano wytrzymałość tkanki kostnej w badaniu obciążeniowym. W przypadku szyjki kości udowej miejscem badania był środek szyjki, gdzie najczęściej dochodzi do złamania. W obu przypadkach wartość wskaźnika przewidywanej wytrzymałości kości korespondowała ze zmianami parametrów wytrzymałościowych badanych metodą dynamiczną.

Tkanka kostna charakteryzuje się stałym współistnieniem dwóch procesów – kościotworzenia i resorpcji. Dynamika tych procesów może być oceniana za pomocą uwalnianych z tkanki kostnej wskaźników, tzw. biochemicznych markerów obrotu kostnego, które mogą być oznaczane w surowicy lub moczu (229). Markery obrotu kostnego to fragmenty białkowych

elementów strukturalnych kości lub produkty ich degradacji oraz enzymy i białka uwalniane do krwi w czasie aktywności metabolicznej osteoblastów i osteoklastów. Na podstawie analizy ich stężenia można wnioskować o tempie procesów zachodzących w przebiegu chorób metabolicznych układu kostnego oraz skuteczności terapii zmian zanikowych. Jednymi z ważniejszych są: frakcja kostna fosfatazy zasadowej (bALP ang. bone alkaline phosphatase) oraz osteokalcyna (OC) – oba służą do oceny procesów osteogenezy. Do markerów osteolizy (resorpcji) należą natomiast produkty degradacji kolagenu macierzy kostnej, między innymi C-końcowy (CTX) usieciowany telopeptyd łańcucha α kolagenu typu I (230).

Wyniki przeprowadzonych analiz wyraźnie wskazują na istotne zmniejszenie stężenia osteokalcyny oraz frakcji kostnej alkalicznej fosfatazy (bALP) w krwi szczurów poddanych zabiegom orchidektomii, co świadczy o zaburzeniu procesów osteogenezy. Podanie testosteronu oraz większej dawki oleju arganowego spowodowało utrzymanie procesów osteogenezy poprzez pobudzenie aktywności osteoblastów na poziomie obserwowanym w grupie SHO. Grupa otrzymująca mniejszą dawkę oleju arganowego wykazała nieznaczną, w porównaniu do grupy ORX-PhS tendencję wzrostową wyników stężenia OC i bALP. Zakładany efekt terapeutyczny wykazała najwyższa wyższa dawka oleju arganowego, co potwierdzone zostało stężeniem C-końcowego usieciowanego telopeptydu łańcucha alfa kolagenu typu I (CTX-I). Największe wartości obserwowano w grupie ORX-PhS, podczas gdy w grupie ORX-TEST oraz ORX-AO150 wartości stężenia były nieznacznie wyższe (ORX-TEST) lub na zbliżonym poziomie (ORX-AO150) do obserwowanego w grupie operowanej rzekomo otrzymującej płyn fizjologiczny, co w połączeniu z wynikami dotyczącymi OC i bALP świadczy o stabilizacji procesów resorpcji wywołanych gonadektomią i protekcyjnym wpływie większej dawki oleju arganowego. Podobne zależności dotyczące stężenia CTX-I, OC i bALP obserwowali także inni autorzy (200, 231, 232).

Otrzymane w toku doświadczenia wyniki dowodzą pozytywnego oddziaływania oleju arganowego i zawartych w nim substancji czynnych na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwijającej się osteopenii wywołanej obustronną orchidektomią. Analiza parametrów densytometrycznych, tomograficznych, wytrzymałościowych jak i stężeń biochemicznych markerów metabolizmu tkanki kostnej wskazuje na protekcyjny wpływ oleju arganowego i hamowanie resorpcji tkanki kostnej spowodowanej brakiem oddziaływania hormonów płciowych oraz stymulację kościotworzenia. Po przeprowadzeniu kwerendy w dostępnych bazach danych (PubMed, WoS) (słowa kluczowe: argan oil, female/male rat, orchietomy/orchidectomy, ovariectomy, bone metabolism) nie znaleziono prac dotyczących wpływu oleju arganowego na metabolizm tkanki kostnej w warunkach gonadektomii, co świadczy o aktualności podjętych badań.

Należy również podkreślić, że 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 w tym modyfikację nawyków żywieniowych ukierunkowanych na wprowadzanie jak najwcześniej do diety substancji pochodzenia naturalnego o znanym potencjale antyosteoporotycznym.

11. Wnioski

1. Olej arganowy wykazuje działanie osteoprotekcyjne u samców szczurów z rozwijającą się osteopenią indukowaną obustronną orchidektomią. Efekty protekcyjne są skorelowane z dawką stosowanej substancji.
2. Podanie niższej dawki tj. 0,5 mg/kg m.c oleju arganowego wywołuje ograniczony do tkanki zbitej efekt osteoprotekcyjny, natomiast dawka 1,5 mg/kg m.c hamuje w pełni zmiany zanikowe tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej.
3. Olej arganowy w wyższej dawce wywiera działanie ochronne w odniesieniu do odporności mechanicznej tkanki kostnej na działanie dynamicznych sił obciążeniowych, w warunkach braku sterydowych hormonów płciowych pochodzenia gonadalnego, co jest szczególnie pożądane w przypadku protekcji złamań szyjki kości udowej.
4. Uzyskane w oparciu o analizę densytometryczną, tomograficzną, wytrzymałościową oraz poziom markerów metabolizmu kostnego wyniki, dowodzą potencjalnej możliwości wykorzystania oleju arganowego w profilaktyce rozwoju schorzeń metabolicznych tkanki kostnej u zwierząt, jak i u ludzi.

12. Piśmiennictwo

1. Rondanelli M, Faliva MA, Barrile GC, Cavioni A, Mansueto F, Mazzola G, et al.: Nutrition, Physical Activity, and Dietary Supplementation to Prevent Bone Mineral Density Loss: A Food Pyramid. *Nutrients*. 2021, 14(1).
2. Iguacel I, Miguel-Berges ML, Gomez-Bruton A, Moreno LA, Julian C. Veganism, vegetarianism, bone mineral density, and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2019, 77(1), 1-18.
3. Lee Y, Park K. Adherence to a Vegetarian Diet and Diabetes Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2017, 9(6).
4. Dinu M, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Sofi F. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017, 57(17), 3640-49.
5. Fresan U, Sabate J. Vegetarian Diets: Planetary Health and Its Alignment with Human Health. *Adv Nutr*. 2019, 10(Suppl_4), S380-S388.
6. Webster J, Greenwood DC, Cade JE. Risk of hip fracture in meat-eaters, pescatarians, and vegetarians: results from the UK Women's Cohort Study. *BMC Med*. 2022, 20(1), 275.
7. Davey GK, Spencer EA, Appleby PN, Allen NE, Knox KH, Key TJ. EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr*. 2003, 6(3), 259-69.
8. Tucker KL. Vegetarian diets and bone status. *Am J Clin Nutr*. 2014, 100 Suppl 1, 329S-35S.
9. Bailey RL, van Wijngaarden JP. The Role of B-Vitamins in Bone Health and Disease in Older Adults. *Curr Osteoporos Rep*. 2015, 13(4), 256-61.
10. Zofková I, Nemcikova P, Matucha P. Trace elements and bone health. *Clin Chem Lab Med*. 2013, 51(8), 1555-61.
11. Advani S, Wimalawansa SJ. Bones and nutrition: common sense supplementation for osteoporosis. *Curr Womens Health Rep*. 2003, 3(3), 187-92.
12. Guillaume D, Charrouf Z. Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011, 113(4), 403-08.
13. Bae J-Y, Kim JL, Kang Y-H. Ellagic acid prevents ultraviolet radiation-induced chronic skin damage of skin cells and in the hairless mice. *The FASEB Journal*. 2009, 23(S1), 353.8-53.8.
14. Ruas MT, M. Ettahiri, AS. Fili, A. Staevel Van, JP.: Archaeobotanical research at the medieval fortified site of Igilitz (Anti-Atlas, Morocco) with particular reference to the exploitation of the argan tree. *Veget Hist Archaeobot*. 2011, 20, 419-33.
15. El Abbassi A, Khalid N, Zbakh H, Ahmad A. Physicochemical characteristics, nutritional properties, and health benefits of argan oil: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014, 54(11), 1401-14.
16. Mohammed F, Guillaume D, Warland JS, Abdulwali N. Analytical methods to detect adulteration of argan oil: A critical review. *Microchemical Journal*. 2021, 168, 106501.
17. Charrouf Z, Guillaume D. Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol*. 1999, 67(1), 7-14.
18. Wilczyński SW, M. Deda, A. Zdybel, M.: Porównanie właściwości antyoksydacyjnych metodą EPR wybranych olei roślinnych stosowanych w kosmetologii. *Polish Journal of Cosmetology*. 2010, 13, 139-46.
19. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003, 38(4), 343-52.

20. de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol.* 2000, 78(1), 31-9.
21. El Midaoui A, Haddad Y, Filali-Zegzouti Y, Couture R. Argan Oil as an Effective Nutri-Therapeutic Agent in Metabolic Syndrome: A Preclinical Study. *Int J Mol Sci.* 2017, 18(11).
22. El Kebbaj R, Bouchab H, Tahri-Joutey M, Rabbaa S, Limami Y, Nasser B, et al.: The Potential Role of Major Argan Oil Compounds as Nrf2 Regulators and Their Antioxidant Effects. *Antioxidants (Basel).* 2024, 13(3).
23. Monfalouti HC, Z. Belviso, S. Ghirardello, D. Scursatone, B. Guillaume, D. Denhez, C. Zeppa, G.: Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa*(L.) Skeels). *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012, 114, 446-52.
24. Charrouf AG, D.: Argan oil, the 35-years-of-research product. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014, 116, 1-7.
25. Berrougui H, Ettaib A, Herrera Gonzalez MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani-Kabchi N, Hmamouchi M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol.* 2003, 89(1), 15-8.
26. Drissi A, Girona J, Cherki M, Godàs G, Derouiche A, El Messal M, et al.: Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr.* 2004, 23(5), 1159-66.
27. Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, et al.: Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005, 15(5), 352-60.
28. Sour S, Belarbi M, Khaldi D, Benmansour N, Sari N, Nani A, et al.: Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *The British journal of nutrition.* 2012, 107(12), 1800-05.
29. Sour S, Belarbi M, Sari N, Benammar CH, Baghdad CH, Visioli F. Argan oil reduces, in rats, the high fat diet-induced metabolic effects of obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015, 25(4), 382-7.
30. Alaoui K, Lagorce JF, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H, Roquebert J. [Analgesic and anti-inflammatory activity of saponins of *Argania spinosa*]. *Ann Pharm Fr.* 1998, 56(5), 220-8. Activite analgesique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*.
31. Sergeant S, Rahbar E, Chilton FH. Gamma-linolenic acid, Dihomo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *Eur J Pharmacol.* 2016, 785, 77-86.
32. Stark AH, Crawford MA, Reifen R. Update on alpha-linolenic acid. *Nutr Rev.* 2008, 66(6), 326-32.
33. Kiage JN, Sampson UK, Lipworth L, Fazio S, Mensah GA, Yu Q, et al.: Intake of polyunsaturated fat in relation to mortality among statin users and non-users in the Southern Community Cohort Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015, 25(11), 1016-24.
34. Nestel P, Clifton P, Colquhoun D, Noakes M, Mori TA, Sullivan D, et al.: Indications for Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. *Heart Lung Circ.* 2015, 24(8), 769-79.
35. Minihane AM, Armah CK, Miles EA, Madden JM, Clark AB, Caslake MJ, et al.: Consumption of Fish Oil Providing Amounts of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid That Can Be Obtained from the Diet Reduces Blood Pressure in Adults with Systolic Hypertension: A Retrospective Analysis. *J Nutr.* 2016, 146(3), 516-23.
36. Yamagata K. Docosahexaenoic acid regulates vascular endothelial cell function and prevents cardiovascular disease. *Lipids Health Dis.* 2017, 16(1), 118.

37. Zheng J, Huang T, Yu Y, Hu X, Yang B, Li D. Fish consumption and CHD mortality: an updated meta-analysis of seventeen cohort studies. *Public Health Nutr.* 2012, 15(4), 725-37.
38. Materac E, Marczyński Z, Bodek K. Rola kwasów tłuszczowych omega-3 i omega-6 w organizmie człowieka. 2013, XLVI(2), 225-33.
39. Bazan N. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain pathology.* 2005, 15(2), 159-66.
40. Holman RT. The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr.* 1998, 128(2 Suppl), 427s-33s.
41. Das UN. Essential Fatty acids - a review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006, 7(6), 467-82.
42. Leaf A. Omega-3 fatty acids and prevention of arrhythmias. *Curr Opin Lipidol.* 2007, 18(1), 31-4.
43. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al.: n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2006, 84(1), 5-17.
44. Errasfa M. Culinary Argan oil: Its chemical composition and associated health benefits. *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research.* 2017, 4(2), 137-47.
45. Barham JB, Edens MB, Fonteh AN, Johnson MM, Easter L, Chilton FH. Addition of eicosapentaenoic acid to gamma-linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. *J Nutr.* 2000, 130(8), 1925-31.
46. Khanna S, Jaiswal KS, Gupta B. Managing Rheumatoid Arthritis with Dietary Interventions. *Front Nutr.* 2017, 4, 52.
47. Boussetta T, Raad H, Lettéron P, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Driss F, et al.: Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One.* 2009, 4(7), e6458.
48. Saha SS, Ghosh M. Comparative study of antioxidant activity of alpha-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food Chem Toxicol.* 2009, 47(10), 2551-6.
49. Saha SS, Ghosh M. Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers against oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model. *Food Chem Toxicol.* 2010, 48(12), 3398-405.
50. Saha SS, Ghosh M. Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. *Chem Biol Interact.* 2011, 190(2-3), 109-20.
51. Dhar P, Bhattacharyya D, Bhattacharyya DK, Ghosh S. Dietary comparison of conjugated linolenic acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) and alpha-tocopherol effects on blood lipids and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *Lipids.* 2006, 41(1), 49-54.
52. Dhar P, Ghosh S, Bhattacharyya DK. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids.* 1999, 34(2), 109-14.
53. Igarashi M, Miyazawa T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Lett.* 2000, 148(2), 173-9.
54. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem.* 2013, 13(2), 201-10.

55. Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, et al.: Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovascular Diabetology*. 2015, 14(1), 75.
56. Carrillo C, Cavia Mdel M, Alonso-Torre S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutr Hosp*. 2012, 27(4), 978-90.
57. Pacheco YM, López S, Bermúdez B, Abia R, Villar J, Muriana FJ. A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. *J Nutr Biochem*. 2008, 19(3), 200-5.
58. Linos A, Kaklamanis E, Kontomerkos A, Koumantaki Y, Gazi S, Vaiopoulos G, et al.: The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis--a case control study. *Scand J Rheumatol*. 1991, 20(6), 419-26.
59. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, et al.: Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum*. 1990, 33(6), 810-20.
60. Lipworth L, Martínez ME, Angell J, Hsieh CC, Trichopoulos D. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev Med*. 1997, 26(2), 181-90.
61. Assmann G, de Backer G, Bagnara S, Betteridge J, Crepaldi G, Fernandez-Cruz A, et al.: Olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Br J Nurs*. 1997, 6(12), 675-7.
62. Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, et al.: Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer*. 1994, 58(6), 774-80.
63. Simonsen NR, Fernandez-Crehuet Navajas J, Martin-Moreno JM, Strain JJ, Huttunen JK, Martin BC, et al.: Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Am J Clin Nutr*. 1998, 68(1), 134-41.
64. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011, 155(2), 117-30.
65. Panagiotakos DB, Dimakopoulou, K., Katsouyanni, K., Bellander, T., Grau, M., Koenig, W., Lanki, T., Pistelli, R., Schneider, A., Peters, A.: Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors. *International Journal of Epidemiology*. 38(3), 856-66.
66. Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, et al.: The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis*. 2007, 194(2), e141-6.
67. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. 2008, 337, a1344.
68. Gardener H, Wright CB, Gu Y, Demmer RT, Boden-Albala B, Elkind MS, et al.: Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study. *Am J Clin Nutr*. 2011, 94(6), 1458-64.
69. Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, et al.: Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol*. 2015, 14, 75.

70. Rodrigues HG, Takeo Sato F, Curi R, Vinolo MAR. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *Eur J Pharmacol.* 2016, 785, 50-58.
71. Whelan J, Fritsche K. Linoleic acid. *Adv Nutr.* 2013, 4(3), 311-2.
72. Norris LE, Collene AL, Asp ML, Hsu JC, Liu LF, Richardson JR, et al.: Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2009, 90(3), 468-76.
73. Mahendran Y, Ågren J, Uusitupa M, Cederberg H, Vangipurapu J, Stančáková A, et al.: Association of erythrocyte membrane fatty acids with changes in glycemia and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2014, 99(1), 79-85.
74. Imamura F, Micha R, Wu JH, de Oliveira Otto MC, Otite FO, Abioye AI, et al.: Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomised Controlled Feeding Trials. *PLoS Med.* 2016, 13(7), e1002087.
75. Wroniak M, Maszewska M. Oliwa z oliwek w diecie śródziemnomorskiej. *Żywność Nauka Technologia Jakość.* 2011, 18(5).
76. Marfil R, Giménez R, Martínez O, Bouzas PR, Rufián-Henares JA, Mesías M, et al.: Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2011, 113(7), 886-93.
77. *Vitamin B and Vitamin E- Pleiotropic and Nutritional Benefits.* Rijeka: IntechOpen; 2024.
78. Eitenmiller RLJ, W.O. Ye, L.: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences 2ed.* Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 74.
79. Collier A, Lemaire B. Carotenoids of argan oil. *Cah Nutr Diet.* 1974, 9, 300-01.
80. Lizard G, Filali-Zegzouti Y, Midaoui AE. Benefits of Argan Oil on Human Health-May 4-6 2017, Errachidia, Morocco. *Int J Mol Sci.* 2017, 18(7).
81. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al.: Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol.* 2023, 97(10), 2499-574.
82. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007, 9(6), 813-39.
83. Ogura S, Shimosawa T. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep.* 2014, 16(8), 452.
84. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000, 87(10), 840-4.
85. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003, 17(1), 24-38.
86. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994, 74(1), 139-62.
87. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003, 108(16), 1912-6.
88. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999, 85(8), 753-66.
89. Hadjigogos K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med.* 2003, 45(1), 7-13.
90. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum.* 1998, 27(6), 392-9.

91. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24(5), 816-23.
92. Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2005, 7(3), 242-8.
93. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008, 3 Suppl 3(Suppl 3), S131-9.
94. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009, 19(3), 171-80.
95. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2011, 32(1), 31-63.
96. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011, 6, 121-45.
97. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1092, 385-96.
98. *Fizjologia noworodka z elementami patofizjologii.: PWRiL; 2011.*
99. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014, 3, 481.
100. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int.* 2001, 12(12), 989-95.
101. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, et al.: Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res.* 2005, 20(2), 185-94.
102. Baczyk G, Opala T, Kleka P, Chuchracki M. Multifactorial analysis of risk factors for reduced bone mineral density among postmenopausal women. *Arch Med Sci.* 2012, 8(2), 332-41.
103. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 2007, 32(2), 103-10.
104. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008, 473(2), 139-46.
105. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997, 390(6656), 175-9.
106. Min JK, Kim YM, Kim YM, Kim EC, Gho YS, Kang IJ, et al.: Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J Biol Chem.* 2003, 278(41), 39548-57.
107. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al.: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 253(2), 395-400.
108. Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, Ogata N, Shimoaka T, Takato T, et al.: Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res.* 2001, 16(11), 2074-81.
109. Mukohyama H, Ransjo M, Taniguchi H, Ohyama T, Lerner UH. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and

- downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 271(1), 158-63.
110. Zdzisińska BK-S, M.: Rola RANK/RANKL i OPG w szpiczaku plazmocytowym. *Post Hig Med Dosw*. 2006, 60, 471-82.
111. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*. 2001, 92(3), 460-70.
112. Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, et al.: Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2003, 278(47), 47217-22.
113. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004, 15(6), 457-75.
114. Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 269(2), 532-6.
115. Lloyd SA, Yuan YY, Kostenuik PJ, Ominsky MS, Lau AG, Morony S, et al.: Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcif Tissue Int*. 2008, 82(5), 361-72.
116. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, et al.: RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J*. 2003, 17(14), 2163-5.
117. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004, 292(4), 490-5.
118. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 89(2), 309-19.
119. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al.: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998, 12(9), 1260-8.
120. Li Y, Bu G. LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future Oncol*. 2005, 1(5), 673-81.
121. Liu G, Bafico A, Harris VK, Aaronson SA. A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol Cell Biol*. 2003, 23(16), 5825-35.
122. Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas*. 2014, 78(3), 233-7.
123. Wolski H, Drweska-Matelska N, Seremak-Mrozikiewicz A, Lowicki Z, Czerny B. The role of Wnt/beta-catenin pathway and LRP5 protein in metabolism of bone tissue and osteoporosis etiology [Rola szlaku sygnałowego Wnt/beta-katenina oraz białka LRPS w metabolizmie tkanki kostnej oraz etiologii osteoporozy]. *Ginek Pol*. 2015, 86(4), 311-4.
124. Kozinski K, Dobrzyn A. [Wnt signaling pathway--its role in regulation of cell metabolism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013, 67, 1098-108. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki.
125. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008, 4(2), 68-75.
126. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000, 407(6803), 535-8.
127. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al.: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 2000, 407(6803), 530-5.

128. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al.: Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005, 8(5), 751-64.
129. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007, 9 Suppl 1(Suppl 1), S1.
130. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013, 5(3), a015081.
131. Wu D, Li L, Wen Z, Wang G. Romosozumab in osteoporosis: yesterday, today and tomorrow. *J Transl Med*. 2023, 21(1), 668.
132. Szczyński G, Brodzikowska A, Galus R, Włodarski P, Włodarski KH. Regulation of Bone Homeostasis by Osteocytes. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2015, 17(6), 567-675.
133. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al.: Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*. 2008, 283(9), 5866-75.
134. Spatz JM, Wein MN, Gooi JH, Qu Y, Garr JL, Liu S, et al.: The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *J Biol Chem*. 2015, 290(27), 16744-58.
135. Rochefort GY, Benhamou CL. Osteocytes are not only mechanoreceptive cells. *Int J Numer Method Biomed Eng*. 2013, 29(10), 1082-8.
136. Kato M, Patel MS, Lévassieur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, et al.: Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 2002, 157(2), 303-14.
137. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, et al.: High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*. 2003, 18(6), 960-74.
138. Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*. 2005, 132(1), 49-60.
139. Akhter MP, Wells DJ, Short SJ, Cullen DM, Johnson ML, Haynatzki GR, et al.: Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone*. 2004, 35(1), 162-9.
140. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, et al.: The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*. 2001, 61(8), 3299-307.
141. Namani A, Li Y, Wang XJ, Tang X. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1843(9), 1875-85.
142. Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules*. 2014, 19(7), 10074-89.
143. Menale C, Robinson LJ, Palagano E, Rigoni R, Erreni M, Almarza AJ, et al.: Absence of Dipeptidyl Peptidase 3 Increases Oxidative Stress and Causes Bone Loss. *J Bone Miner Res*. 2019, 34(11), 2133-48.
144. Lippross S, Beckmann R, Streubesand N, Ayub F, Tohidnezhad M, Campbell G, et al.: Nrf2 deficiency impairs fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int*. 2014, 95(4), 349-61.
145. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*. 2009, 44(6), 1026-33.
146. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, et al.: Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*. 2007, 282(37), 27285-97.

147. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017, 14(2), 209-16.
148. Rajska-Neumann A. Osteoporoza - definicja, epidemiologia, rozpoznawanie, leczenie i profilaktyka. Osteoporosis - definition, epidemiology, diagnosing, treatment and prophylaxis. *Farmacja Współczesna.* 2008, 1, 47-53.
149. Krysiak R. Osteoporoza jako problem społeczny –patogeneza, objawy, czynniki ryzyka i leczenie. 2018. Available from: <https://www.forumginekologii.pl/artykul/osteoporoza-jako-problem-spoeczny-patogeneza-objawy-czynniki-ryzyka-i-leczenie>.
150. Bandeira L, Silva BC, Bilezikian JP. Male osteoporosis. *Arch Endocrinol Metab.* 2022, 66(5), 739-47.
151. Rinonapoli G, Ruggiero C, Meccariello L, Bisaccia M, Ceccarini P, Caraffa A. Osteoporosis in Men: A Review of an Underestimated Bone Condition. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(4).
152. Liu H, Paige NM, Goldzweig CL, Wong E, Zhou A, Suttrop MJ, et al.: Screening for osteoporosis in men: a systematic review for an American College of Physicians guideline. *Ann Intern Med.* 2008, 148(9), 685-701.
153. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, et al.: Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. *J Bone Miner Res.* 2006, 21(1), 124-31.
154. Macdonald HM, Nishiyama KK, Kang J, Hanley DA, Boyd SK. Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: a population-based HR-pQCT study. *J Bone Miner Res.* 2011, 26(1), 50-62.
155. Kirby RS, Fitzpatrick JM, Clarke N. Abarelix and other gonadotrophin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *BJU Int.* 2009, 104(11), 1580-4.
156. Weaver CM, Alexander DD, Boushey CJ, Dawson-Hughes B, Lappe JM, LeBoff MS, et al.: Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2016, 27(1), 367-76.
157. LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, et al.: The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2022, 33(10), 2049-102.
158. Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 21(2), 89-95.
159. Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. *J Bone Miner Res.* 2000, 15(11), 2169-77.
160. LeBlanc ES, Nielson CM, Marshall LM, Lapidus JA, Barrett-Connor E, Ensrud KE, et al.: The effects of serum testosterone, estradiol, and sex hormone binding globulin levels on fracture risk in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009, 94(9), 3337-46.
161. Woo J, Kwok T, Leung JC, Ohlsson C, Vandenput L, Leung PC. Sex steroids and bone health in older Chinese men. *Osteoporos Int.* 2012, 23(5), 1553-62.
162. Pepping J. DHEA: dehydroepiandrosterone. *Am J Health Syst Pharm.* 2000, 57(22), 2048-50, 53-4, 56.
163. Kirby DJ, Buchalter DB, Anil U, Leucht P. DHEA in bone: the role in osteoporosis and fracture healing. *Arch Osteoporos.* 2020, 15(1), 84.
164. Villareal DT, Holloszy JO, Kohrt WM. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000, 53(5), 561-8.

165. Zhang YW, Song PR, Wang SC, Liu H, Shi ZM, Su JC. Diets intervene osteoporosis via gut-bone axis. *Gut Microbes*. 2024, 16(1), 2295432.
166. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, et al.: Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int*. 2005, 16(7), 737-42.
167. . Management of osteoporosis in postmenopausal women: the 2021 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2021, 28(9), 973-97.
168. Christianson MS, Shen W. Osteoporosis prevention and management: nonpharmacologic and lifestyle options. *Clin Obstet Gynecol*. 2013, 56(4), 703-10.
169. Singaram S, Naidoo M. The physical, psychological and social impact of long bone fractures on adults: A review. *Afr J Prim Health Care Fam Med*. 2019, 11(1), e1-e9.
170. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, et al.: Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA*. 2004, 291(16), 1999-2006.
171. Veronese N, Maggi S. Epidemiology and social costs of hip fracture. *Injury*. 2018, 49(8), 1458-60.
172. Williamson S, Landeiro F, McConnell T, Fulford-Smith L, Javaid MK, Judge A, et al.: Costs of fragility hip fractures globally: a systematic review and meta-regression analysis. *Osteoporos Int*. 2017, 28(10), 2791-800.
173. Sing CW, Lin TC, Bartholomew S, Bell JS, Bennett C, Beyene K, et al.: Global Epidemiology of Hip Fractures: Secular Trends in Incidence Rate, Post-Fracture Treatment, and All-Cause Mortality. *J Bone Miner Res*. 2023, 38(8), 1064-75.
174. Piccin D, Morshead CM. Potential and pitfalls of stem cell therapy in old age. *Disease Models & Mechanisms*. 2010, 3(7-8), 421-25.
175. Strehler BL, Mildvan AS. General theory of mortality and aging. *Science*. 1960, 132(3418), 14-21.
176. Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL. Aging-related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku J Exp Med*. 2007, 213(3), 261-8.
177. Skalny AV, Aschner M, Silina EV, Stupin VA, Zaitsev ON, Sotnikova TI, et al.: The Role of Trace Elements and Minerals in Osteoporosis: A Review of Epidemiological and Laboratory Findings. *Biomolecules*. 2023, 13(6).
178. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, et al.: Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2017, 97(1), 135-87.
179. Sophocleous A, Idris AI. Ovariectomy/Orchiectomy in Rodents. *Methods Mol Biol*. 2019, 1914, 261-67.
180. Gasser JA, Willnecker J. Bone Measurements by Peripheral Quantitative Computed Tomography in Rodents. *Methods Mol Biol*. 2019, 1914, 533-58.
181. 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. *Ann Agric Environ Med*. 2017, 24(3), 446-52.
182. Szulc P, Kaufman JM, Delmas PD. Biochemical assessment of bone turnover and bone fragility in men. *Osteoporos Int*. 2007, 18(11), 1451-61.
183. Lorenc R, Głuszko P, Franek E, Jabłoński M, Jaworski M, Kalinka-Warzochoa E, et al.: Zalecenia postępowania diagnostycznego i leczniczego w osteoporozie w Polsce. Aktualizacja 2017. *Endokrynol Pol*. 2017, 68(A), 1-18.

184. Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res.* 2015, 30(5), 920-8.
185. Binkley N, Krueger D, Buehring B. What's in a name revisited: should osteoporosis and sarcopenia be considered components of "dysmobility syndrome?". *Osteoporos Int.* 2013, 24(12), 2955-9.
186. Himes CL, Reynolds SL. Effect of obesity on falls, injury, and disability. *J Am Geriatr Soc.* 2012, 60(1), 124-9.
187. Marcus RL, Addison O, Dibble LE, Foreman KB, Morrell G, Lastayo P. Intramuscular adipose tissue, sarcopenia, and mobility function in older individuals. *J Aging Res.* 2012, 2012, 629637.
188. Lorentzon M, Branco J, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, Cooper C, et al.: Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis, Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis. *Adv Ther.* 2019, 36(10), 2811-24.
189. Marcinowska-Suchowierska E, Czerwiński E, Badurski J, Walicka M, Tałałaj M. Osteoporoza: diagnostyka i terapia u osób starszych. *Postępy Nauk Medycznych.* 2011, 24(5).
190. Tay WL, Tay D. Discontinuing Denosumab: Can It Be Done Safely? A Review of the Literature. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2022, 37(2), 183-94.
191. Kendler DL, Cosman F, Stad RK, Ferrari S. Denosumab in the Treatment of Osteoporosis: 10 Years Later: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2022, 39(1), 58-74.
192. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008, 83(9), 1032-45.
193. Ma S, Goh EL, Jin A, Bhattacharya R, Boughton OR, Patel B, et al.: Long-term effects of bisphosphonate therapy: perforations, microcracks and mechanical properties. *Sci Rep.* 2017, 7, 43399.
194. Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejkovska K, Zivny P. Protective effect of amlodipine on rat bone tissue after orchidectomy. *Pharmacology.* 2012, 89(1-2), 37-43.
195. Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejkovska K, Zivny P. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 2012, 679(1-3), 144-50.
196. Al-Shahat AR, Shaikh MA, Elmansy RA, Shehzad K, Kaimkhani ZA. Prostatic assessment in rats after bilateral orchidectomy and calcitonin treatment. *Endocr Regul.* 2011, 45(1), 29-36.
197. Juma SS, Ezzat-Zadeh Z, Khalil DA, Hooshmand S, Akhter M, Arjmandi BH. Soy protein with or without isoflavones failed to preserve bone density in gonadal hormone-deficient male rat model of osteoporosis. *Nutr Res.* 2012, 32(9), 694-700.
198. Shen CL, Cao JJ, Dagda RY, Tenner TE, Jr., Chyu MC, Yeh JK. Supplementation with green tea polyphenols improves bone microstructure and quality in aged, orchidectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 2011, 88(6), 455-63.
199. Radzki RP, Bienko M, Filip R, Pierzynowski SG. The Protective and Therapeutic Effect of Exclusive and Combined Treatment with Alpha-ketoglutarate Sodium Salt and Ipriflavone on Bone Loss in Orchidectomized Rats. *J Nutr Health Aging.* 2016, 20(6), 628-36.
200. Ryu SJ, Ryu DS, Kim JY, Park JY, Kim KH, Chin DK, et al.: Changes in Bone Metabolism in Young Castrated Male Rats. *Yonsei Med J.* 2016, 57(6), 1386-94.
201. Ryu SJ, Ryu DS, Kim JY, Park JY, Kim KH, Chin DK, et al.: Bone Mineral Density Changes after Orchiectomy using a Scrotal Approach in Rats. *Korean J Spine.* 2015, 12(2), 55-9.

202. Broulik PD, Rosenkrancová J, Růžicka P, Sedláček R. Effect of alendronate administration on bone mineral density and bone strength in castrated rats. *Horm Metab Res.* 2005, 37(7), 414-8.
203. Jayusman PA, Mohamed IN, Shuid AN. The Effects of Chemical Castration with Degarelix on Bone Turnover: Densitometric and Biomechanics Bone Properties of Male Rats. *Int J Endocrinol Metab.* 2018, 16(3), e64038.
204. Cauley JA, Ellenberg SS, Schwartz AV, Ensrud KE, Keaveny TM, Snyder PJ. Effect of testosterone treatment on the trabecular bone score in older men with low serum testosterone. *Osteoporos Int.* 2021, 32(11), 2371-75.
205. Snyder PJ, Kopperdahl DL, Stephens-Shields AJ, Ellenberg SS, Cauley JA, Ensrud KE, et al.: Effect of Testosterone Treatment on Volumetric Bone Density and Strength in Older Men With Low Testosterone: A Controlled Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2017, 177(4), 471-79.
206. Nakamura Y, Naito M, Hayashi K, Fotovati A, Abu-Ali S. Effect of combined treatment with alendronate and calcitriol on femoral neck strength in osteopenic rats. *J Orthop Surg Res.* 2008, 3, 51.
207. Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, et al.: The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone.* 2006, 38(1), 136-44.
208. Reim NS, Breig B, Stahr K, Eberle J, Hoeflich A, Wolf E, et al.: Cortical Bone Loss in Androgen-Deficient Aged Male Rats Is Mainly Caused by Increased Endocortical Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2008, 23(5), 694-704.
209. Yeh PS, Lee YW, Chang WH, Wang W, Wang JL, Liu SH, et al.: Biomechanical and tomographic differences in the microarchitecture and strength of trabecular and cortical bone in the early stage of male osteoporosis. *PLoS One.* 2019, 14(8), e0219718.
210. Shi Q, Lajeunesse D, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Dehnade F, et al.: Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol.* 2002, 29(7), 1437-45.
211. Nakamura Y, Hayashi K, Abu-Ali S, Naito M, Fotovati A. Effect of preoperative combined treatment with alendronate and calcitriol on fixation of hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *J Bone Joint Surg Am.* 2008, 90(4), 824-32.
212. Gomes NA, Guarengi GG, Valenga HM, Warnavin S, Chaves JDP, Cardoso AC, et al.: Mandibular-related bone metabolism in orchietomized rats treated with sex hormones. *Arch Oral Biol.* 2021, 122, 105000.
213. Gomez MA, Nahum AM. *Biomechanics of Bone.* In: Nahum AM, Melvin JW, editors. *Accidental Injury: Biomechanics and Prevention.* New York, NY: Springer New York; 2002. p. 206-27.
214. Einhorn TA. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int.* 1992, 51(5), 333-9.
215. Järvinen TL, Sievänen H, Jokihaara J, Einhorn TA. Revival of bone strength: the bottom line. *J Bone Miner Res.* 2005, 20(5), 717-20.
216. Oxlund BS, Ørtoft G, Andreassen TT, Oxlund H. Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. *Bone.* 2003, 32(1), 69-77.
217. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature.* 2001, 412(6847), 603-4.

218. Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone*. 2002, 30(3), 445-52.
219. Rubin C, Turner AS, Müller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, et al.: Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res*. 2002, 17(2), 349-57.
220. Roesler H. The history of some fundamental concepts in bone biomechanics. *J Biomech*. 1987, 20(11-12), 1025-34.
221. Frost HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod*. 1994, 64(3), 175-88.
222. Landete-Castillejos T, Currey JD, Estevez JA, Gaspar-López E, Garcia A, Gallego L. Influence of physiological effort of growth and chemical composition on antler bone mechanical properties. *Bone*. 2007, 41(5), 794-803.
223. Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech*. 1971, 4(2), 155-8.
224. Niu Y, Du T, Liu Y. Biomechanical Characteristics and Analysis Approaches of Bone and Bone Substitute Materials. *J Funct Biomater*. 2023, 14(4).
225. Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*. 1994, 15(5), 523-32.
226. Danielsen CC, Mosekilde L, Andreassen TT. Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int*. 1992, 50(2), 169-74.
227. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int*. 1993, 52(1), 26-33.
228. Radzki RP, Bienko M, Wolski D, Lis A, Radzka A. Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016, 94(9), 947-54.
229. Szulc P, Naylor K, Hoyle N, Eastell R, Leary E, Project NBHABTM. Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability. *Osteoporosis International*. 2017, 28, 2541-56.
230. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer J, Goemaere S, et al.: Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: A consensus document of the Belgian Bone Club. *International journal of clinical practice*. 2009, 63, 19-26.
231. Martín-Fernández M, Garzón-Márquez FM, Díaz-Curiel M, Prieto-Potin I, Alvarez-Galovich L, Guede D, et al.: Comparative study of the effects of osteoprotegerin and testosterone on bone quality in male orchidectomised rats. *Aging Male*. 2020, 23(3), 189-201.
232. Sakr HF, Hussein AM, Eid EA, Boudaka A, Lashin LS. Impact of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in a Rat Model of Male Hypogonadism. *Vet Sci*. 2020, 7(4).

13. Streszczenie

Schorzenie metaboliczne układu kostnego jakim jest osteoporoza przez wiele lat uważano za chorobę charakterystyczną dla płci żeńskiej. Obecnie jednak wiemy, że utrata masy tkanki kostnej dotyczy również mężczyzn, a także jest nieodłącznie związana z procesem starzenia się. Osteoporoza u mężczyzn, podobnie jak u kobiet, charakteryzuje się niską masą kostną, nieprawidłową mikroarchitekturą tkanki kostnej i związaną z tym większą podatnością na urazy i złamania.

Wyniki badań wskazują, jednakże na istnienie u mężczyzn różnic dotyczących epidemiologii, lokalizacji złamań oraz budowy samej tkanki kostnej i procesów patofizjologicznych w niej zachodzących. Mniejsza częstotliwość występowania osteoporozy u mężczyzn związana jest z faktem, iż szczytowa gęstość mineralna kości (BMD) u mężczyzn jest o około 8 do 10% wyższa niż kobiet. Wpływa to więc na wyższą u mężczyzn szczytową masę kostną. Męski układ szkieletowy charakteryzuje się także większymi rozmiarami samych kości, a tym samym obciążenia mechaniczne jakie są generowane podczas aktywności fizycznej rozkładane są na większy obszar przekroju poprzecznego kości. Zwiększony rozmiar układu kostnego jest pochodną działania androgenów, które już od początku okresu dojrzewania wpływają na okostną u mężczyzn. Wraz z wiekiem, bardziej u mężczyzn niż u kobiet, wzrasta też zewnętrzna średnica kości. Inaczej również wygląda zachowanie się mikrostruktury beleczek kostnych w zależności od płci. U mężczyzn w miarę starzenia się dochodzi do przerzedzenia się beleczek kostnych, lecz nie ich utraty. U kobiet natomiast starzenie jest bardziej związane z perforacją beleczek i utratą połączeń między nimi co jest charakterystyczne dla zjawiska przyspieszonej resorpcji kości na podłożu menopauzalnym. Proces menopauzy u kobiet charakteryzuje się dość gwałtownym spadkiem estrogenów w przeciwieństwie do mężczyzn, u których spadek poziomu androgenów ma wolniejszy charakter i zachodzi stopniowo. Przyspieszenie tego procesu obserwuje się z reguły

dopiero około 70 roku życia co sprawia, że zmiany zanikowe tkanki kostnej u mężczyzn pojawiają się później.

Naturalną konsekwencją obniżonej wytrzymałości mechanicznej szkieletu na działanie sił mechanicznych, związanej z zaburzeniami metabolizmu tkanki kostnej, są złamania. Jednym z najpoważniejszych, ściśle związanym z osteoporozą, jest złamanie szyjki kości udowej, które dotyka zarówno kobiety, jak i mężczyzn.

Masa mineralna kości jest jednym z podstawowych czynników warunkujących jakość szkieletu oraz jego odporność na urazy i przeciążenia wynikające z codziennej aktywności życiowej. Zależy ona od szeregu czynników, które możemy modyfikować (dieta, aktywność fizyczna) lub też od takich, na które nie mamy wpływu (płeć, wiek). Czynniki żywieniowe są jednymi z najłatwiej modyfikowalnych, stąd też od wielu lat prowadzone są badania dotyczące wprowadzania na stałe do codziennej diety lub pod postacią suplementów, tych składników, które działając prewencyjnie będą maksymalnie opóźniały lub hamowały zmiany zanikowe tkanki kostnej. Dlatego celem podjętych badań było określenie osteotropowego wpływu różnych dawek oleju arganowego podawanego *per os* na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwoju zmian zanikowych wywołanych orchidektomią.

W doświadczeniu wykorzystano 40 szczurów szczepu Wistar, z których 8 poddano operacji rzekomej (SHO), zaś u pozostałych (32) wykonano zabiegi orchidektomii (ORX). Po 7-dniowej rekonwalescencji grupie SHO (n=8) oraz losowo wybranej grupie ORX (n=8) rozpoczęto podawanie płynu fizjologicznego. Pozostałe grupy otrzymywały testosteron (7mg/kg m.c./7 dni s.c.) oraz dwie dawki oleju arganowego (0,5 i 1,5 ml/100 g m.c *p.o.*). Po 60 dniach zwierzęta z całości doświadczenia poddano eutanazji. Bezpośrednio po niej wykonano badanie densytometryczne (DXA) całego szkieletu. Pobrano także krew (surowicę), które zamrożono do dalszych analiz stężenia markerów metabolizmu kostnego (CTX-I, bALP, OC). W kolejnym etapie

wyzolowano obie kości udowe, na których przeprowadzono badanie tomograficzne (pQCT) w połowie długości trzonu i określono jego cechy geometryczne oraz zanalizowano parametry tkanki kostnej zbitej. W dalszej części przynasadowej określono natomiast parametry densytometryczne i strukturalne tkanki kostnej gąbczastej. Oddzielną analizę densytometryczną (DXA) i tomograficzną (pQCT) przeprowadzono dla szyjki kości udowej. Przy pomocy pQCT określono przewidywaną wytrzymałość mechaniczną kości w połowie długości trzonu oraz dla szyjki kości udowej. Celem zbadania rzeczywistej odporności tkanki kostnej na działanie sił dynamicznych przeprowadzono analizę wytrzymałości mechanicznej na złamanie trzonu kości, za pomocą 3-puntowego testu ugięcia, oraz oddzielnego testu kompresji dla szyjki kości udowej.

Otrzymane w toku doświadczenia wyniki dowodzą pozytywnego oddziaływania oleju arganowego i zawartych w nim substancji czynnych na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwijającej się osteopenii wywołanej operacjami orchidektomii. Analiza parametrów densytometrycznych, tomograficznych, wytrzymałościowych jak i stężeń biochemicznych markerów metabolizmu tkanki kostnej wskazuje, że szczególnie większa dawka oleju arganowego, wykazuje protekcyjne i hamujące działanie na resorpcję tkanki kostnej spowodowaną brakiem oddziaływania hormonów płciowych oraz stymuluje kościotworzenie. Uzyskane dane dowodzą potencjalnej możliwości wykorzystania oleju arganowego w profilaktyce rozwoju schorzeń metabolicznych tkanki kostnej u zwierząt jak i ludzi.

Słowa kluczowe: olej arganowy, orchidektomia, szczury, osteoporoza, densytometria

14. Summary

Osteoporosis - a metabolic disease of the skeletal system - for many years was considered a disease specific to women. Nowadays, however, we know that the loss of bone mass also affects men and is inherently related to the ageing process. Osteoporosis in men, as in women, is characterized by low bone mass, abnormal microarchitecture of bone tissue and, therefore, greater susceptibility to injuries and fractures. The results of the current research indicate that men and women have differences in epidemiology, location of fractures, structure of bone tissue and pathophysiological processes occurring in it. The lower incidence of osteoporosis in men is due to the fact that peak bone mineral density (BMD) in men is approximately 8 to 10% higher than in women.

Therefore, this results in higher peak bone mass in men. The male skeletal system is also characterized by larger dimensions of the bones themselves, and thus the mechanical loads generated during physical activity are distributed over a larger cross-sectional area of the bones. The increased size of the skeletal system is a consequence of the action of androgens, which affect the periosteum in men from the beginning of puberty. With age, the outer diameter of the bones also increases, more in men than in women. The behaviour of the microstructure of bone trabeculae also differs depending on gender. As men age, the bone trabeculae thin but are not lost. In women, however, ageing is more associated with perforation of trabeculae and loss of connections between them, which is characteristic of the phenomenon of accelerated bone resorption due to menopause.

The process of menopause in women is characterized by a rapid decrease in estrogen, unlike men, who have a slower and gradual decrease in androgen levels. Acceleration of this process is usually observed only around the age of 70, which causes atrophic changes in bone tissue in men to appear later.

The natural consequence of reduced mechanical strength of the skeleton due to disturbances in bone tissue metabolism is fractures. One of the most serious, closely associated with osteoporosis, is the femoral neck fracture, which affects both women and men. Bone mineral mass is one of the fundamental factors determining the quality of the skeleton and its resistance to injuries and overloads resulting from daily activities. It depends on several factors that we can modify (diet, physical activity) or those over which we have no control (sex, age). Nutritional factors are among the easiest to modify. For many years, research has been conducted on the introduction of components into the daily diet or as supplements, which, by acting preventively, will maximally delay or inhibit degenerative changes in bone tissue. Therefore, the aim of the undertaken research was to determine the osteotropic effect of different doses of argan oil administered orally on the metabolism of bone tissue in male rats under conditions of degenerative changes induced by orchietomy.

The experiment was conducted on 40 Wistar rats, 8 of which underwent a sham operation (SHO), while the remaining 32 orchietomy (ORX). After a 7-day of the convalescence, the SHO group (n=8) and a randomly selected ORX group (n=8) began receiving physiological saline. The remaining groups received testosterone (7 mg/kg b.w./7 days s.c.) or two doses of argan oil (0.5 and 1.5 ml/100 g b.w. p.o.). After 60 days, the animals from the entire experiment were euthanized. Immediately thereafter, a densitometric (DXA) examination of the whole skeleton was performed. Blood (plasma) was also collected and frozen for further analysis of bone metabolism markers (CTX-I, bALP, OC). In the next stage, both femurs were isolated, and a tomographic examination (pQCT) was conducted at midshaft to determine its geometric features and analyze the parameters of the compact bone tissue. In the distal part, densitometric and structural parameters of the trabecular bone tissue were determined. Separate densitometric (DXA) and tomographic (pQCT) analyses were conducted for the femoral neck. Using pQCT, the

predicted mechanical strength of the bone at midshaft and for the femoral neck was determined. To examine the actual resistance of bone tissue to dynamic forces, a mechanical strength analysis was conducted for midshaft fractures using a 3-point bending test and a separate compression test for the femoral neck.

The results obtained during the experiment demonstrate the positive effects of argan oil and its active substances on the metabolism of bone tissue in male rats under conditions of developing osteopenia induced by orchidectomy. Analysis of densitometric, tomographic, strength parameters, and biochemical markers of bone metabolism indicates that particularly the higher dose of argan oil exhibits protective and inhibitory effects on bone resorption caused by the lack of sex hormones and stimulates osteogenesis. The obtained data suggest the potential use of argan oil in the prevention of metabolic bone tissue diseases in animals and humans.

Keyword: argan oil, orchidectomy, rats, osteoporosis, densitometry

15. Spis rycin i tabel.

Rycina 1. Schemat działania głowicy pomiarowej w badaniu wytrzymałościowym.	39
Rycina 2. Gęstość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	41
Rycina 3. Zawartość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	42
Rycina 4. Powierzchnia tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.Ar) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	42
Rycina 5. Gęstość mineralna tkanki kostnej kości udowych (F.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	43
Rycina 6. Zawartość mineralna tkanki kostnej kości udowych (F.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	44
Rycina 7. Powierzchnia tkanki kostnej kości udowych (F.Area) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	45
Rycina 8. Zawartość mineralna tkanki kostnej szyjki kości udowych (S.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	46
Rycina 9. Gęstość mineralna tkanki kostnej szyjki kości udowych (S.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	46
Rycina 10. Gęstość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowych (G.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	47
Rycina 11. Zawartość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowych (G.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	48
Rycina 12. Osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI) kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych wyznaczony w badaniu pQCT. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	58
Rycina 13. Moduł elastyczności Young'a kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	59
Rycina 14. Siła maksymalna kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	60
Rycina 15. Granica sprężystości kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	60
Rycina 16. Moduł elastyczności Young'a szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	62
Rycina 17. Siła maksymalna szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	62
Rycina 18. Granica sprężystości szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	63
Rycina 19. Stężenie osteokalcyny (OC) w osoczu krwi samców szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	64
Rycina 20. Stężenie frakcji kostnej fosfatazy zasadowej (bALP) w osoczu krwi szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych. Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-AO50.	65
Rycina 21. Stężenie C-końcowego usieciowanego telopeptydu łańcucha kolagenu typu I (CTX-I) w osoczu krwi szczurów.	66
Tabela 1. Skład chemiczny oleju arganowego (24).	6
Tabela 2. Parametry skanów densytometrycznych.	36
Tabela 3. Parametry tomograficznej oceny tkanki kostnej zbitej i gąbczastej kości udowych.	38
Tabela 4. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju trzonu kości oraz tkanki kostnej zbitej określone w połowie (50%) długości kości udowych.	51
Tabela 5. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju oraz tkanki kostnej gąbczastej dalszej części przynasadowej kości udowych szczurów.	53
Tabela 6. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju poprzecznego, tkanki kostnej zbitej i tkanki kostnej gąbczastej szyjki kości udowych szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych.	56

16. Wykaz użytych skrótów

ANOVA - analiza wariancji
bALP - frakcja kostnej fosfatazy zasadowej
bFGF - (ang. *basic fibroblast growth factor*) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BMC - (ang. *Bone Mineral Content*) zawartość mineralnej tkanki kostnej
BMD - (ang. *Bone Mineral Density*) - gęstość mineralna tkanki kostnej
BMU - (ang. *bone multicellular unit*) wielokomórkowe jednostki przebudowy kości
BRU - (ang. *bone remodeling unit*) miejscach aktywnej przebudowy
COX-2 - izoenzym cyklooksigenaza-2
CSA - pole powierzchni przekroju poprzecznego
Ct.Ar - powierzchnia tkanki kostnej zbitej
Ct.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej
Ct.Th - grubość tkanki kostnej zbitej
Ct.vBMD - wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitej
CTX-I - C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I
DHA - kwas dokozaheksanowy
DHEA - dehydroepiandrostenon
DHEAS - siarczanowy ester DHEA
DHT - dihydrotestosteron
Dkk1 i Dkk2 - (ang. *Dickkopf related protein-1, -2*) białka Dkk1 i Dkk2
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
DPA - kwas dokozapentaenowy
DXA - (ang. *Dual X-Ray Absorptiometry*) densytometria
E_{mod} - moduł elastyczności Younga
Endo.C - obwód wewnętrzny kości
eNOS - endotelialna syntaza tlenku azotu
EPA - kwas eikozapentaenowy
F.Area - powierzchnia izolowanych kości udowych
F.BMC - zawartość mineralna kości udowych
F.BMD - gęstość mineralna kości udowych
FGF - czynnik wzrostu fibroblastów
F_{max} - siła maksymalna
F_{max} - siła maksymalna
G.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowej
G.BMD - gęstość mineralna tkanki kostnej głowy kości udowej
GCL - ligaza γ -glutamylcysteiny
G_{sp} - granica sprężystości
GST - S-transferaza glutationowa
HDL - (ang. *high-density lipoprotein*) lipoproteina o dużej gęstości
HR-pQCT - (ang. *High Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography*) obwodowa ilościowa tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości
IGF-I - insulinopodobny czynnik wzrostu I
IL-1 - interleukina 1
IL-1 β - interleukina 1- beta
IL-2 - interleukina-2
IL-6 - interleukina 6
LDL - (ang. *low-density lipoprotein*) lipoproteina o małej gęstości
LPR - (ang. *lipoprotein receptor-related proteins*) lipoproteinowe białka receptorowe
M-CSF (ang. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

NO - tlenek azotu
Nrf2 – (ang. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf2)
OA - olej arganowy
OC - osteokalcyna
OPG - osteoprotegryna
ORX - grupa poddana orchidektomii
ORX-OA150 - grupa poddana orchidektomii, której podawano olej arganowy w dawce 1,5 ml/100 g m.c.
ORX-OA50 - grupa poddana orchidektomii, której podawano olej arganowy w dawce 0,5 ml/100 g m.c.
ORX-PhS - grupa poddana orchidektomii, której podawano płyn fizjologiczny
ORX-TEST - grupa poddana orchidektomii, której podawano testosteron
PBM- (ang. *peak bone mass*) szczytowa masa kostna
Peri.C - obwód zewnętrzny kości
PGE-1 - prostaglandyna E1
PGE2 - prostaglandyna E2
pQCT - (ang. *peripheral Quantitative Computed Tomography*) obwodowa ilościowa tomografia komputerowa
PTH - parathormon
RANK – (ang. *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*) receptor jądrowego czynnika κ B
RANKL - (ang. *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*) ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B
ROS - (ang. *Reactive Oxygen Species*) reaktywne formy tlenu
SHO - grupa poddana operacji rzekomej
SOD - dysmutaza nadtlenkowa
sRANKL - (ang. *soluble RANKL*) pierwotna forma rozpuszczalna RANKL
Tb.Ar - powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej
Tb.Ar - powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej
Tb.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej
TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta
TNF- α - (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów
Tot.Ar - całkowita powierzchnia kości
Tot.BMC - całkowita zawartość mineralna kości
Tot.vBMD - całkowita wolumetryczna gęstość mineralna kości
Ts.Area - powierzchnia tkanki kostnej całego szkieletu
Ts.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu
Ts.BMD - gęstość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu
WHO - Światowa Organizacja Zdrowia
Wnt – (ang. *Wingless-related integration site*) rodzina białek sygnalizacyjnych
xSSI - wskaźnik siła-odkształcenie względem osi X